

**Untersuchungen zur positionsspezifischen
Integration des LTR-Retrotransposons DGLT-A im
Genom von *Dictyostelium discoideum***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Fakultät für Biowissenschaften
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biologin
Eva Kling
geboren am 07.06.1986 in Darmstadt

Gutachter:

1. Prof. Dr. Thomas Winckler, Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie,
Institut für Pharmazie, Friedrich-Schiller-Universität Jena
2. Prof. Dr. Christian Hammann, Ribogenetics and Biochemistry Lab,
Department of Life Science and Chemistry, Jacobs University Bremen
3. Prof. Dr. Gerald G. Schumann, Section Human Retroelements,
Division of Medical Biotechnology, Paul-Ehrlich-Institut Langen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 20. August 2019

„Eine Antwort ist immer ein Stück des Weges, der hinter dir liegt.

Nur eine Frage kann uns weiterführen.“

Jostein Gaarder

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 8 |
| 1.1 | Transposable Elemente..... | 8 |
| 1.1.1 | DNA-Transposons | 10 |
| 1.1.2 | Retrotransposons | 11 |
| 1.1.2.1 | Non-LTR-Retrotransposons | 11 |
| 1.1.2.1.1 | Retrotranspositionsmechanismus der Non-LTR-Retrotransposons | 12 |
| 1.1.2.2 | LTR-Retrotransposons | 14 |
| 1.1.2.2.1 | Retrotranspositionsmechanismus der LTR-Retrotransposons | 16 |
| 1.2 | Transposable Elemente in Modellorganismen | 17 |
| 1.2.1 | Die Bäckerhefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 17 |
| 1.2.1.1 | Transposable Elemente in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 18 |
| 1.2.2 | Die soziale Amöbe <i>Dictyostelium discoideum</i> | 19 |
| 1.2.3 | Das Genom von <i>Dictyostelium discoideum</i> | 22 |
| 1.2.3.1 | Transposable Elemente in <i>Dictyostelium discoideum</i> | 23 |
| 1.2.3.1.1 | Non-LTR-Retrotransposons in <i>D. discoideum</i> | 23 |
| 1.2.3.1.2 | YR-Retrotransposons | 25 |
| 1.2.3.1.3 | LTR-Retrotransposons in <i>D. discoideum</i> | 26 |
| 1.3 | Integrationen von transposablen Elementen | 28 |
| 1.3.1 | Das Wechselspiel zwischen Wirt und transposablen Elementen | 28 |
| 1.3.2 | Zielgerichtete Integration von transposablen Elementen | 29 |
| 1.3.3 | Heterochromatin als Integrationsziel | 32 |
| 1.3.4 | tRNA-Gene als Integrationsziel | 34 |
| 1.3.4.1 | Der RNA-Polymerase III-Präinitiationskomplex | 34 |
| 1.3.4.2 | tRNA-Gene im Genom von <i>Dictyostelium discoideum</i> | 36 |
| 1.4 | Zielsetzung der Arbeit | 38 |
| 2 | Material und Methoden | 39 |
| 2.1 | Material..... | 39 |
| 2.1.1 | Laborgeräte | 39 |
| 2.1.2 | Chemikalien | 40 |
| 2.1.3 | Verbrauchsmaterialien | 41 |
| 2.1.4 | Verwendete Kits | 42 |
| 2.1.5 | Verwendete Enzyme und Antikörper | 42 |
| 2.1.6 | Größenstandards | 42 |
| 2.1.7 | Verwendete Peptide | 43 |
| 2.1.8 | Medien | 43 |
| 2.1.9 | Antibiotika | 43 |
| 2.1.10 | Mikroorganismen | 44 |

| | |
|--|-----------|
| 2.1.11 Plasmide und Oligonukleotide | 44 |
| 2.1.12 Programme und Datenbanken | 45 |
| 2.2 Methoden..... | 46 |
| 2.2.1 Molekularbiologische Methoden | 46 |
| 2.2.1.1 PCR | 46 |
| 2.2.2 Zellkultur | 46 |
| 2.2.2.1 Kultivierung von <i>Dictyostelium discoideum</i> | 46 |
| 2.2.2.2 Elektrotransformation von <i>D. discoideum</i> -Zellen | 46 |
| 2.2.2.3 Herstellung von Gefrierkulturen von <i>D. discoideum</i> | 47 |
| 2.2.2.4 Herstellung von Zellpellets | 48 |
| 2.2.2.5 Isolation genomischer DNA | 48 |
| 2.2.2.5.1 Schnellpräparation für PCR | 48 |
| 2.2.2.5.2 genomische DNA hoher Reinheit | 49 |
| 2.2.2.6 Isolation von RNA | 50 |
| 2.2.2.7 cDNA-Synthese | 50 |
| 2.2.2.8 Retrotranspositionstest | 50 |
| 2.2.2.9 Anfärben von <i>D. discoideum</i> -Klonen in Petrischalen | 51 |
| 2.2.3 Biochemische Methoden | 52 |
| 2.2.3.1 Proteinexpression in <i>E. coli</i> -Zellen | 52 |
| 2.2.3.2 Proteinaufreinigung aus <i>E. coli</i> -Zellen | 53 |
| 2.2.3.3 Protein-Protein-Pulldown | 54 |
| 2.2.3.4 Peptid-Protein-Pulldown | 55 |
| 2.2.3.5 SDS-PAGE | 56 |
| 2.2.3.6 Western Blot | 56 |
| 2.2.3.7 Hefe-Zwei-Hybrid-System | 57 |
| 2.2.3.7.1 Herstellung kompetenter Hefezellen des Stammes AH109 | 58 |
| 2.2.3.7.2 Transformation von Hefezellen des Stammes AH109 | 58 |
| 2.2.3.7.3 Isolation von Plasmid-DNA aus transformierten Hefezellen | 59 |
| 2.2.3.7.4 Herstellung von Gefrierkulturen von Hefezellen (AH109) | 60 |
| 2.2.4 Fluoreszenzmikroskopie | 60 |
| 2.2.4.1 Mikroskopie lebender Zellen | 60 |
| 2.2.4.2 Mikroskopie fixierter Zellen | 61 |
| 3 Ergebnisse | 62 |
| 3.1 Proteininteraktionen bei der Erkennung von Integrationszielen durch DGLT-A..... | 62 |
| 3.2 Das Polyprotein von DGLT-A | 65 |
| 3.2.1 Die RT-RNH-Domäne von DGLT-A | 66 |
| 3.2.2 Die Integrase-Domäne von DGLT-A | 68 |
| 3.3 Die TFIIIC-Untereinheit Tfc4 aus <i>Dictyostelium discoideum</i> | 69 |
| 3.4 Interaktionen zwischen DGLT-A-Proteinen und Transkriptionsfaktoren der Polymerase III..... | 72 |
| 3.4.1 Interaktionen der DGLT-A-RNH | 74 |
| 3.4.1.1 Interaktionen zwischen Tfc4 und DGLT-A-RNH | 74 |
| 3.4.1.2 Interaktionen innerhalb der DGLT-A-RNH | 79 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 3.4.2 | Interaktionen der DGLT-A-Integrase | 80 |
| 3.4.2.1 | Interaktionen zwischen Tfc4 und DGLT-A-Integrase | 80 |
| 3.4.2.2 | Untersuchungen zur Interaktion zwischen DGLT-A-Integrase und -RNH | 83 |
| 3.4.2.3 | Untersuchungen zur Interaktion innerhalb der DGLT-A-Integrase-Domäne | 86 |
| 3.4.3 | Untersuchung der Interaktionsflächen der RT-RNH-Domäne von DGLT-A | 88 |
| 3.4.4 | Untersuchung der Interaktionsflächen auf der TFIIIC-Untereinheit Tfc4 TPRs 7-10 | 90 |
| 3.5 | Mobilisierung von genetisch markierten Retrotransposons | 93 |
| 3.5.1 | Das genetisch markierte DGLT-A-Retrotransposon | 96 |
| 3.5.1.1 | Effizienz des Spleißens des <i>mbsrl</i> -Gens in DGLT-A ^{bsr} | 100 |
| 3.5.2 | Skipper-1-Retrotransposon in <i>Dictyostelium discoideum</i> | 102 |
| 3.5.2.1 | Das genetisch markierte Skipper-1 Retrotransposon | 103 |
| 3.6 | Die Chromodomäne von Skipper | 107 |
| 3.6.1 | Interaktionsanalysen zwischen Dd-Skipper-1-CHD und methyliertem H3a <i>in vitro</i> | 110 |
| 3.6.2 | <i>In vivo</i> -Interaktionsanalysen zur Chromodomäne von Skipper-1 in <i>D. discoideum</i> | 112 |
| 4 | Diskussion | 118 |
| 4.1 | DGLT-A benötigt für die zielgerichtete Integration Tfc4 aus dem TFIIIC-Komplex | 118 |
| 4.1.1 | Tfc4 als Hotspot für Proteininteraktionen | 119 |
| 4.1.2 | Die Rolle der RNH während der Retrotransposition | 122 |
| 4.1.3 | Die Rolle der Integrase während der Retrotransposition | 124 |
| 4.2 | DGLT-A und Ty3 finden das gleiche Integrationsziel über unterschiedliche molekulare Mechanismen | 125 |
| 4.3 | Amplifikation und Integration des artifiziellen Retrotransposons DGLT-A ^{bsr} | 129 |
| 4.4 | Die Chromodomäne von Skipper | 133 |
| 5 | Zusammenfassung | 137 |
| 6 | Abstract | 139 |
| 7 | Literatur | 140 |
| 8 | Anhang | 155 |
| 8.1 | Abkürzungsverzeichnis | 155 |
| 8.2 | Abbildungsverzeichnis | 157 |
| 8.3 | Tabellenverzeichnis | 160 |
| 8.4 | Verwendete Oligonukleotide | 161 |
| 8.5 | Hergestellte und verwendete Plasmide | 163 |
| 8.5.1 | Hergestellte Plasmide | 163 |
| 8.5.2 | Zusätzlich verwendete Plasmide | 167 |
| 8.6 | Liste der wissenschaftlichen Publikationen | 169 |
| 8.7 | Eigenständigkeitserklärung | 170 |
| 8.8 | Danksagung | 171 |

1 Einleitung

1.1 Transposable Elemente

Transposable Elemente (TEs), auch Transposons oder mobile Elemente genannt, sind DNA-Sequenzen, die die Fähigkeit besitzen innerhalb einer Zelle ihre genetische Position zu verändern (Craig *et al.* 2002).

In den 1940er Jahren postulierte die amerikanische Wissenschaftlerin Barbara McClintock durch Experimente mit *Zea mays*, dass mobile DNA existiert und entdeckte das erste transposable Element, welches sie als Ds (*Dissociation*) bezeichnete (McClintock 1948, McClintock 1950). Diese Entdeckung stieß zunächst auf große Skepsis innerhalb der wissenschaftlichen Gemeinschaft, so galt bis dahin die Vorstellung, dass DNA, als genetisches Material, statisch, stabil und immobil sein muss. Spätere Bezeichnungen wie „*selfish*“ oder „*junk*“-DNA zeigten weiterhin auf, welchen Stellenwert die transposablen Elemente vorerst in der Wissenschaft einnahmen (Orgel und Crick 1980). Erst im Laufe der Zeit und mit der Verfügbarkeit moderner molekularbiologischer Methoden wurde man sich über die Bedeutsamkeit der mobilen Elemente bewusst. So sind Transposons in nahezu allen prokaryotischen und eukaryotischen Genomen zu finden (Zaratiegui 2013) und es wurde deutlich, dass oftmals beachtliche Anteile der gesamten genomischen DNA von diesen eingenommen werden. So besteht die genomische DNA von Pilzen zwischen 3 bis 20 %, von Tieren zwischen 3 bis 45 % und von Bakterien zwischen 1 bis 10 % aus Sequenzen, die Transposons zugeordnet werden können. Das Genom einiger Pflanzen kann sogar bis zu 90 % aus mobilen Elementen bestehen (Daboussi und Capy 2003, Filee *et al.* 2007, Hua-Van *et al.* 2005, Mahillon und Chandler 1998, SanMiguel *et al.* 1996). Es scheint zudem eine Korrelation zwischen Genomgröße und dem darin enthaltenen Anteil an Transposons zu geben, denn vor allem Genome höherer Organismen beinhalten viele dieser Elemente (Sun *et al.* 2012). Beispielsweise nehmen Transposons im menschlichen Genom einen Anteil von ca. 50 % ein (Lander *et al.* 2001). Transposable Elemente lassen sich, basierend auf dem Mechanismus ihrer Transposition, in zwei große Klassen einteilen. Klasse-I-Transposons, die Retrotransposons, welche mittels eines RNA-Intermediats transponieren und die Klasse-II-Transposons, welche als DNA-Transposons bezeichnet werden und sich über ein DNA-Intermediat replizieren (Wicker *et al.* 2007) (siehe Abbildung 1).

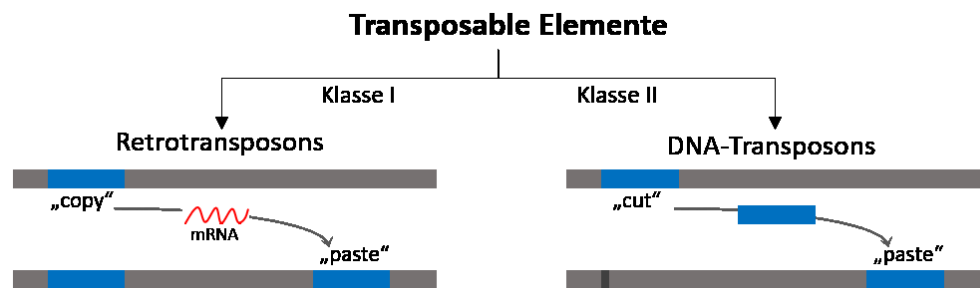


Abbildung 1: Integrationsmechanismen von Retrotransposons und DNA-Transposons

Links: Integrationsmechanismus von Retrotransposons. Das Retrotransposon verbleibt am Ursprungsort der DNA und wird über ein RNA-Intermediat kopiert, welches mittels Reverser Transkriptase in DNA umgeschrieben wird, um an einem neuen Ort zu integrieren. Rechts: Integrationsmechanismus von DNA-Transposons. Das Transposon wird mittels eigener Transposase aus der DNA geschnitten und an einem anderen Ort im Genom wieder integriert.

Die DNA-Transposons werden in der Regel über den „*cut-and-paste*“-Mechanismus mobilisiert. Mittels der eigenen Transposase werden diese Elemente an einem Ursprungsort im Genom ausgeschnitten und an einem anderen Ort wieder integriert (Finnegan 1989). Dabei bleibt die Anzahl der mobilen Elemente im Genom konstant. Eine Vermehrung dieser kann jedoch während der Zellteilung stattfinden, wenn eine Transposition von einer Schwesterchromatide auf die andere erfolgt (Parks *et al.* 2009). Anders hingegen bei den Retrotransposons. Sie nutzen einen „*copy-and-paste*“-Mechanismus. Dabei replizieren sie über ein RNA-Zwischenprodukt, welches revers in eine DNA-Sequenz transkribiert wird und an einer neuen Position ins Genom integriert (Finnegan 1989). Somit werden die Retrotransposons bei jedem Transpositionseignis amplifiziert (Deininger und Batzer 2002) (siehe Abbildung 1). Das Verhältnis der beiden Transposon-Klassen innerhalb eines Genoms ist von Organismus zu Organismus unterschiedlich (Feschotte und Pritham 2007).

Die Transposons können innerhalb ihrer Klassen zusätzlich in autonome und nicht-autonome Elemente unterteilt werden. Ein mobiles Element wird als autonom bezeichnet, wenn es die für die Transposition benötigten Proteine eigenständig kodiert und sich somit mobilisieren kann. Nicht-autonome Elemente besitzen hingegen keine oder unvollständige proteinkodierende offene Leserahmen (ORFs) und sind daher auf die Proteine der autonomen Elemente angewiesen (*Trans-Mobilisierung*) (Hartl *et al.* 1992).

1.1.1 DNA-Transposons

DNA-Transposons sind überwiegend in den Genomen von Bakterien verbreitet, man findet sie jedoch auch in einigen Eukaryoten (Craig *et al.* 2002). Die Elemente zeigen oft das Phänomen des sogenannten „*local hoppings*“. Dabei integrieren sie in direkter Nachbarschaft zu ihren vorherigen Integrationsorten (Kazazian 2004). Aktive autonome DNA-Transposons kodieren für ein Enzym namens Transposase und werden durch invertierte Sequenzwiederholungen (*inverted repeats, IR*) flankiert. Die Transposase besitzt eine Endonuklease-Funktion. Durch die Hydrolyse einer Phosphodiesterbindung der DNA wird das Transposon aus seiner ursprünglichen DNA-Position ausgeschnitten und an neuer Stelle integriert (Craig *et al.* 2002) (siehe Abbildung 2). Durch den versetzten Doppelstrangbruch in der Zielsequenz kommt es dort oft zu Sequenzverdopplungen (*target-site duplication, TSD*) von 4 bis 8 bp (Levin und Moran 2011). Eine Vermehrung der DNA-Transposons kann nur innerhalb der Zellteilung stattfinden (Fedoroff 1989).

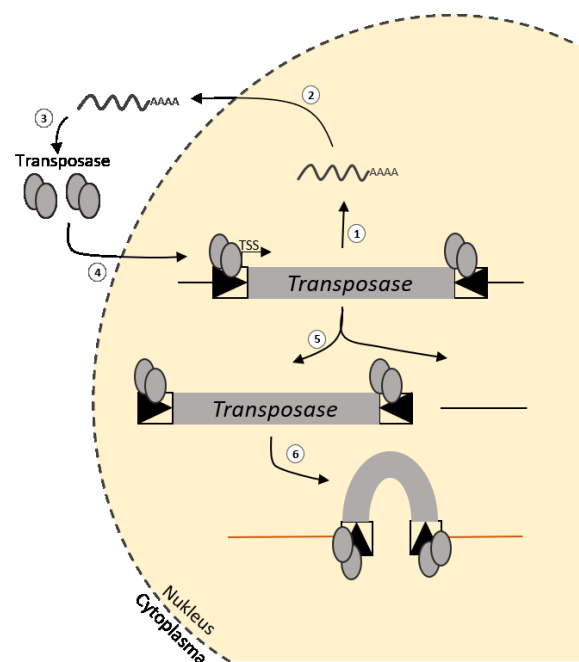


Abbildung 2: Mechanismus der Transposition von DNA-Transposons

Schematische Darstellung des Transpositions-Mechanismus von DNA-Transposons. Transkription des *Transposase*-Gens (1) und Transport der mRNA ins Cytoplasma (2). Translation (3). Der Integrationskomplex assembliert im Cytoplasma und muss die Kernmembran passieren, um wieder Zugang zur DNA zu erhalten (4). DNA-Transposase bindet an IRs (schwarze Dreiecke) (5), welche das Transposon flankieren. Dadurch kommt es zum Doppelstrangbruch der DNA und das DNA-Transposon kann an einem anderen Ort der DNA (orange-farbene Linie) integrieren (6). TSS: *transcription start site*. Abbildung verändert nach Sultana *et al.* 2017.

1.1.2 Retrotransposons

Das charakteristische Merkmal dieser Klasse-I-Transposons ist die Nutzung einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der Reversen Transkriptase (RT). Anhand des strukturellen Aufbaus der RT, mit ihren konservierten Domänen, und dem Mechanismus ihrer Transposition, unterscheidet man innerhalb der Retrotransposons zwischen zwei großen Gruppen: den LTR-Retrotransposons und den Non-LTR-Retrotransposons (Wicker *et al.* 2007).

1.1.2.1 Non-LTR-Retrotransposons

Die Non-LTR-Retrotransposons kommen in eukaryotischen Zellen vor und werden synonym auch als LINEs (*long interspersed nuclear elements*) bezeichnet. Das humane L1-Element verkörpert den Prototyp eines solchen autonomen Non-LTR-Retrotransposons (Kazazian 2004). Dieses ist ca. 4-6 kb lang und besitzt normalerweise zwei offene Leserahmen (ORFs). ORF1 codiert für ein RNA-bindendes Protein (Martin *et al.* 2000), ORF2 codiert die für die Retrotransposition benötigten Proteine: Endonuklease und Reverse Transkriptase (Feng *et al.* 1996, Finnegan 2012, Mathias *et al.* 1991). Flankiert werden diese Elemente jeweils am 5'- und am 3'-Ende von zwei untranslatierten Regionen (UTR). Die UTR am 5'-Ende besitzt meist eine RNA-Polymerase II-Promotoraktivität (Schumann *et al.* 1994, Swergold 1990), die UTR am 3'-Ende enthält ein Terminationssignal, ein Polyadenylierungssignal und eine Struktur zur Bindung der Reversen Transkriptase (Anzai *et al.* 2005, Batzer und Deininger 2002, Ostertag und Kazazian 2001b) (siehe Abbildung 3).

Innerhalb der Non-LTR-Retrotransposons wird zudem zwischen autonomen und nicht-autonomen Elementen unterschieden. Nicht-autonome Elemente können nicht eigenständig transponieren, da ihnen die dafür benötigten Enzyme fehlen. Sie sind meist um einiges kürzer (ca. 300 bp), werden als SINEs (*short interspersed nuclear elements*) bezeichnet (Ohshima und Okada 2005) und können ausschließlich *in trans* mobilisiert werden (Finnegan 2012, Raiz *et al.* 2012). Ein typischer Vertreter der SINEs ist das zu 10 % im menschlichen Genom vorkommende Alu-Element (Batzer und Deininger 2002, Lander *et al.* 2001) (siehe Abbildung 3).

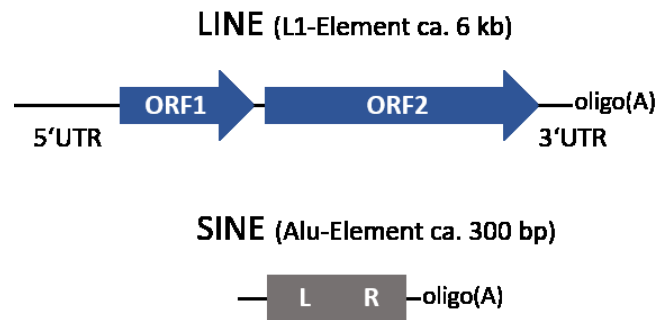


Abbildung 3: Schematischer Aufbau der LINE- und SINE-Elemente

LINE: Prototyp der autonomen Non-LTR-Retrotransposons. Abgebildet ist das L1-Element bestehend aus ORF1 und ORF2, den 5'- und 3'-UTR inklusive Poly-A-Signal.

SINE: Repräsentativ für ein nicht-autonomes Non-LTR-Retrotransposon ist das Alu-Element. Das Element besteht aus 2 ähnlichen Sequenzen. Dem linken Monomer (L) und dem rechten Monomer (R) inklusive eines Poly-A-Signals. Abbildung verändert nach Lander *et al.* 2001.

1.1.2.1.1 Retrotranspositionsmechanismus der Non-LTR-Retrotransposons

Der Retrotranspositionsmechanismus der Non-LTR-Retrotransposons beginnt mit der Transkription der eigenen DNA-Sequenz im Zellkern durch die zelleigene RNA-Polymerase II (Ostertag und Kazazian 2001b). Die dabei synthetisierte RNA ist beides, das Transpositions-Intermediat und die Matrize für die codierten Transposon-Proteine (siehe Abbildung 4). Die mRNA wird durch die Kernmembran in das Cytoplasma exportiert, wo die Translation des bicistronischen Transkripts in die Proteine ORF1 und ORF2 stattfindet. Das ORF1-Protein kann Trimere formen und bindet an die mRNA, das ORF2-Protein besitzt die Funktionen einer Endonuklease und einer Reversen Transkriptase (EN und RT). ORF1- und ORF2-Proteine assemblieren daraufhin gemeinsam mit der Transposon-RNA und formen dabei den Ribonuklein-Proteinkomplex (RNP), welcher die Kernmembran passieren muss um wieder Zugang zur Wirts-DNA zu erhalten. Im Nukleus angelangt, erfolgt der für Non-LTR-Retrotransposons typische TPRT- (*target primed reverse transcription*)-Mechanismus (Luan und Eickbush 1995, Luan *et al.* 1993).

Beim TPRT-Mechanismus assembliert das RNA-Intermediat gemeinsam mit dem ORF1 und dem ORF2-Protein an einem spezifischen Abschnitt innerhalb der Wirts-DNA. Im Fall von L1 bindet dieses an einen AT-reichen Sequenzabschnitt was dem RNA-Intermediat mit seiner Poly(A)-Sequenz am 3'-Ende eine komplementäre Bindung an die DNA, und der Synthetisierung der cDNA durch die Reverse Transkriptase des Retrotransposons ermöglicht

(Finnegan 2012, Luan *et al.* 1993, Ostertag und Kazazian 2001a) (siehe Abbildung 4 rechts). Die während des Vorgangs anwesende Retrotransposon-Endonuklease schneidet die Ziel-DNA versetzt, weshalb zelleigene Reparaturmechanismen die dabei entstandenen Überhänge auffüllen und es zu den charakteristischen Zielsequenzduplikationen (*target site duplication*, TSD) im Wirtsgenom kommt (Feng *et al.* 1996, Gilbert *et al.* 2002).

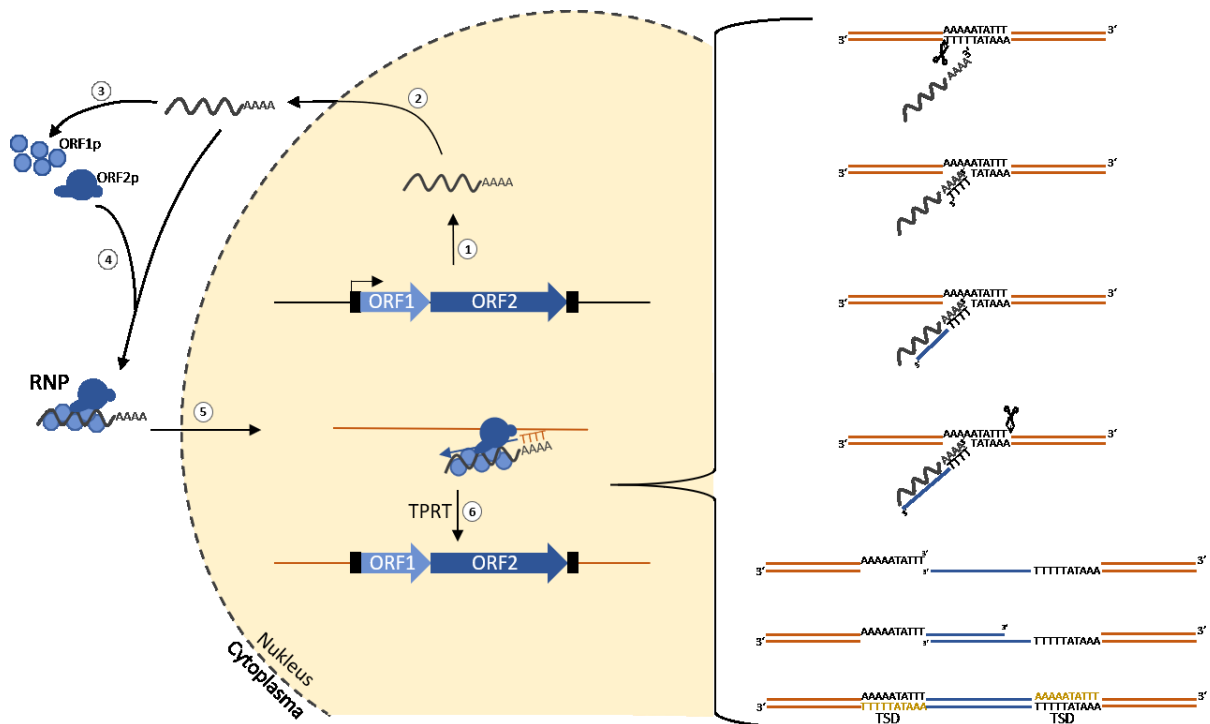


Abbildung 4: Non-LTR-Retrotranspositionsmechanismus

Links: Schematische Darstellung des „Lebenszyklus“ von Non-LTR-Retrotransposons. Transkription der RNA (1) und Transport der mRNA ins Cytoplasma (2). Translation der ORF1- und ORF2-Proteine (3). Proteine und mRNA assemblieren im Cytoplasma zu dem RNP (4) dieser muss die Kernmembran passieren um wieder Zugang zur DNA zu erhalten (5). RNP bindet an die Ziel-DNA. Es erfolgt eine reverse Transkription nach dem TPRT-Mechanismus (6). Rechts: Veranschaulichung des TPRT-Mechanismus. TSD: *target site duplication*

Abbildung verändert nach Sultana *et al.* 2017 und Finnegan 2012.

1.1.2.2 LTR-Retrotransposons

LTR-Retrotransposons sind mobile Elemente, die insbesondere in den Genomen von Pflanzen große Teile einnehmen können (Lisch 2013), jedoch auch in zahlreichen anderen eukaryotischen Organismen vertreten sind (Havecker *et al.* 2004). Das charakteristische Merkmal dieser Retrotransposons sind deren *Long Terminal Repeats* (LTRs) am 5'- und 3'-Ende des Elements. Dabei handelt es sich um direkte, terminale Sequenzwiederholungen, die mehrere Hundert Basenpaare lang sein können (Finnegan 2012). Ein LTR setzt sich aus drei Einheiten zusammen, der U3-, der R- und der U5-Region, welche essentiell für die Durchführung der Retrotransposition des Elements sind (Boeke und Corces 1989). Die meisten LTR-Retrotransposons sind 5-7 kb lang und besitzen zwei ORFs. Diese codieren für das Gag-Protein (*group specific antigen*) und das Polyprotein (Pol) (Holton *et al.* 2001). Das Gag-Gen codiert die Proteine, welche für die *Virus like particles* (VLP) benötigt werden (Matthews *et al.* 1997). In ihnen findet die reverse Transkription statt. Das Pol-Gen codiert für ein Polyprotein, welches sich aus folgenden Domänen zusammensetzt: Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT) mit Ribonuklease H (RNH) und Integrase (IN) (Havecker *et al.* 2004). Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten in der Anordnung beider ORFs. Gag-Domäne und Polyprotein können in einem gemeinsamen Leseraster liegen, wie es bei dem LTR-Retrotransposon DGLT-A aus *Dictyostelium discoideum* der Fall ist (Glöckner *et al.* 2001), oder die Gag- und Pol-Proteine sind in zwei, sich oftmals überlappende, Leserastern eingeteilt. Die Gene der getrennten ORFs werden dann als gemeinsame RNA transkribiert. Die Translation erfolgt durch ein *Frameshift* des Ribosoms oder durch das Überlesen des Stoppcodons im Gag-Gen (Gao *et al.* 2003, Wilhelm und Wilhelm 2001).

Die LTR-Retrotransposons können, basierend auf der Phylogenie ihrer RT-Domäne, in drei große Gruppen unterteilt werden: die Ty1/copia-, Bel- und Ty3/gypsy-Gruppe. Ty1 und Ty3 sind mobile Elemente aus *Saccharomyces cerevisiae*, wohingegen Copia, Bel und Gypsy aus *Drosophila melanogaster* stammen (Eickbush und Jamburuthugoda 2008). Die 3 Gruppen werden, nach neuerer taxonomischer Klassifizierung, nochmals in die zwei Hauptgruppen *Pseudoviridae* und *Metaviridae* aufgeteilt (Boeke *et al.* 2006) (siehe Abbildung 5).

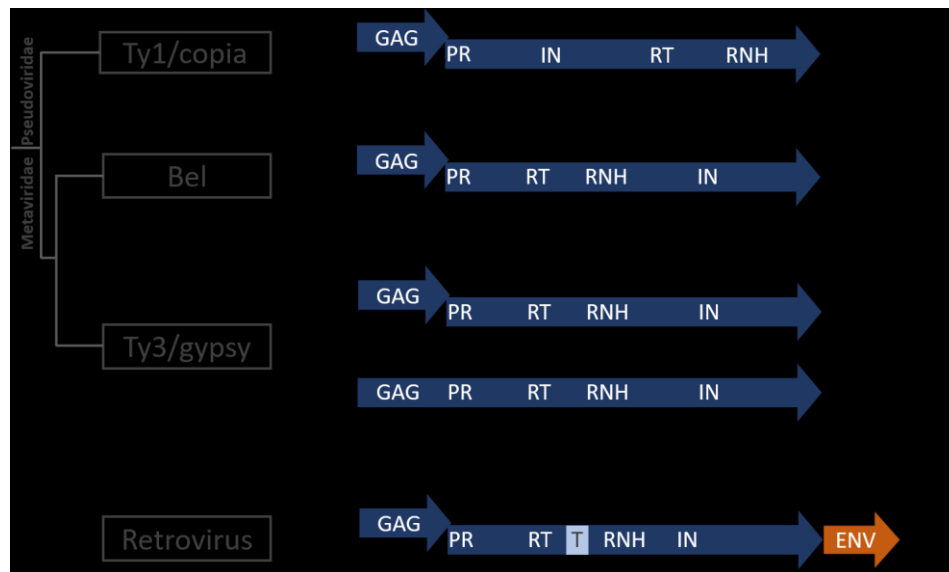


Abbildung 5: Struktur und phylogenetische Einordnung der LTR-Retrotransposons

Struktureller (rechts) und grober phylogenetischer Überblick (links) über die drei großen Gruppen der LTR-Retrotransposons im Vergleich zu Retroviren. Ty3 und DGLT-A als Vertreter der Ty3/gypsy-Gruppe.

GAG: *group-specific antigen*; PR: Protease, RT: Reverse Transkriptase; RNH: Ribonuklease-H-; IN: Integrase; schwarze Dreiecke definieren die LTRs: *long-terminal repeats*. ENV: *envelope*; T: *tether*.

Abbildung verändert nach Eickbush und Jamburuthugoda 2008.

Die Grundstruktur der LTR-Elemente ist ähnlich zu der von Retroviren. In den Bel- und Ty3/gypsy-Elementen ist die Anordnung der Domänen des Polyproteins gleich zu denen der Retroviren, wohingegen in der Ty1/copia-Gruppe die IN-Domäne am N-Terminus der RT/RNH-Domäne liegt (Eickbush und Jamburuthugoda 2008). Allen LTR-Retrotransposon-Gruppen fehlt jedoch ein *Env* (*envelope*)-Gen, welches für Hüllproteine codiert, die den Retroviren einen horizontalen Gentransfer ermöglichen (Malik *et al.* 2000) (siehe Abbildung 5). Es wurde durch phylogenetische Analysen nachgewiesen, dass die Retroviren aus den LTR-Retrotransposons hervorgegangen sind (Xiong und Eickbush 1990). Auch der Retrotranspositionsmechanismus von Retroviren und LTR-Elementen wird im Wesentlichen auf die gleiche Weise durchgeführt.

1.1.2.2.1 Retrotranspositionsmechanismus der LTR-Retrotransposons

Der Retrotranspositionsmechanismus der LTR-Retrotransposons wurde bisher in den mobilen Elementen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* am intensivsten untersucht und beschrieben (Boeke und Corces 1989). Die dabei entdeckten Vorgänge der Retrotransposition können jedoch auch auf andere LTR-Retrotransposons und deren Wirte adaptiert werden (Craig *et al.* 2002).

Die Retrotransposition der LTR-Elemente beginnt mit der Transkription einer genomischen Transposon-Kopie durch die zelleigene RNA-Polymerase II. Transkriptionsstart und -stop liegt jeweils in den R-Regionen der LTRs. Das prozessierte Transkript wird dann durch die Zellmembran ins Cytoplasma exportiert um dort in zwei Proteintypen (Gag und Pol) translatiert zu werden. Die Gag- und Gag-Pol-Proteine assemblieren daraufhin gemeinsam mit der RNA im Cytoplasma und bilden den VLP (*Virus like particle*) (siehe Abbildung 6, rechts). Dort findet die reverse Transkription der Transposon-RNA und damit die Generierung der cDNA, einer neuen LTR-Retrotransposon-Kopie, statt. Dieser *Multi-Step*-Mechanismus ist im Vergleich zu dem TPRT-Mechanismus der Non-LTR-Elemente um einiges komplizierter. Die Synthese des ersten DNA-Strangs startet durch eine Translokation einer als Primer fungierenden, für jedes Retrotransposon spezifischen Wirts-tRNA. Der komplementäre Strang wird danach über die Anlagerung eines RNA-Moleküls an eine Poly-Purin-Region (*poly purin tract*, PPT) gestartet und synthetisiert (siehe Abbildung 6, links) (Finnegan 2012, Kazazian 2004, Labrador und Corces 1997, Lauermann und Boeke 1997). Die dadurch entstandene komplette Kopie eines LTR-Retrotransposons wird gemeinsam mit der Integrase und anderen Proteinen als Präintegrationskomplex (PIC) zurück in den Nukleus transportiert, wo dieser als sogenanntes Intersom einen neuen DNA-Ort identifiziert und die Transposon-Kopie integriert wird (Boeke 2013, Boeke und Chapman 1991). Wie bei den Non-LTR-Retrotransposons kommt es dabei zu Zielsequenzduplikationen (TSD) im Genom (Boeke und Corces 1989).

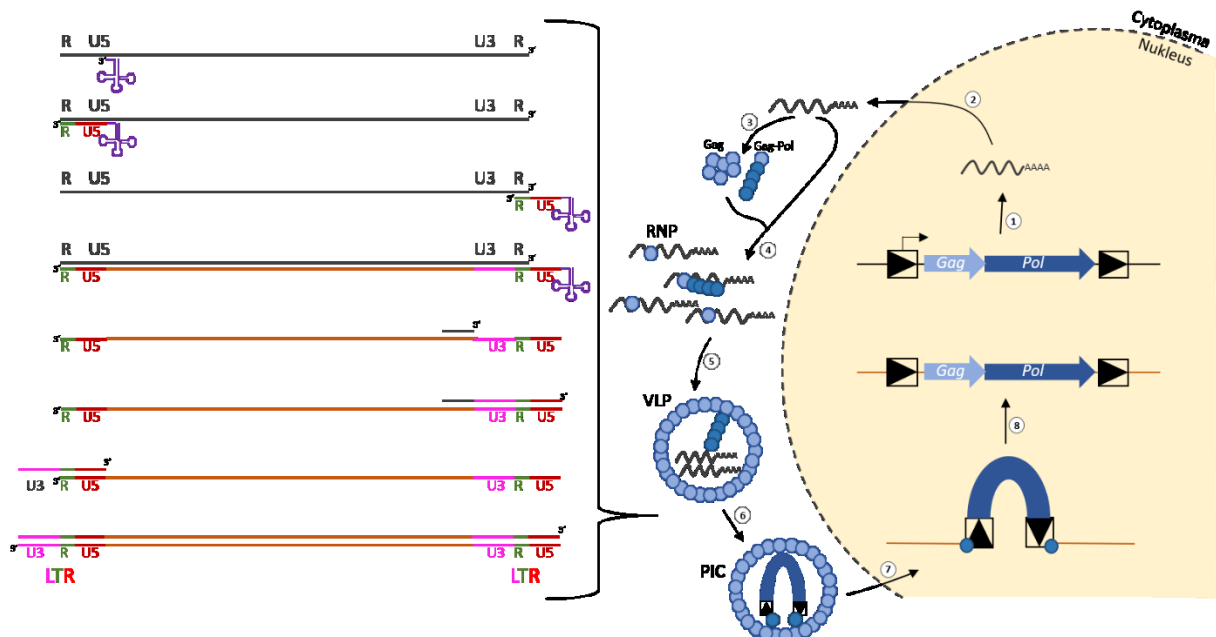


Abbildung 6: LTR-Retrotranspositionsmechanismus

Rechts: Schematische Darstellung des „Lebenszyklus“ von LTR-Retrotransposons. Transkription der RNA (1) und Transport der mRNA ins Cytoplasma (2). Translation der Gag- und Gag-Pol-Proteine (3). Proteine und mRNA assemblieren im Cytoplasma zu dem RNP (4) und VLP (5). Im VLP findet die reverse Transkription statt. Nachdem eine vollständige Kopie des Retrotransposons generiert wurde (6) wird dieses gemeinsam mit anderen Proteinen als Präintegrationskomplex (PIC) durch die Kernmembran in den Nukleus transportiert (7). Proteine des PIC (blaue Kugeln) binden an Ziel-DNA und integrieren die neue Kopie des LTR-Retrotransposons. Links: Verdeutlichung des reversen Transkription im VLP. LTR: *long terminal repeat*

Abbildung verändert nach Sultana *et al.* 2017 und Finnegan 2012.

1.2 Transposable Elemente in Modellorganismen

Die vollständige Entschlüsselung der Genome zahlreicher biologischer Modellorganismen zeigt, dass transposable Elemente in all diesen genetisch untersuchten Organismen vorkommen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mobile Elemente aus zwei Modellorganismen genauer betrachtet: der sozialen Amöbe *Dictyostelium discoideum* und der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*.

1.2.1 Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae ist ein einzelliger Organismus, der innerhalb der Supergruppe der Pilze (*Fungi*) zu der Ordnung der *Saccharomyceten* zählt. Das haploide Genom dieses Modellorganismus war das erste eukaryotische Genom, welches vollständig sequenziert

werden konnte. Es ist 12.052 kb groß und besteht aus 16 Chromosomen (Goffeau *et al.* 1996). Das Genom beinhaltet 6275 potentielle ORFs von denen nur 5885 in Proteine translatiert werden, die eine durchschnittliche Länge von 1,45 kb besitzen und zwischen denen ein durchschnittlicher Abstand von nur 2 kb liegt. Rund 72 % des gesamten Genoms von *S. cerevisiae* besteht aus ORFs, was das Genom sehr kompakt macht (Goffeau 2000, Goffeau *et al.* 1996). Grund dafür sind unter anderem die zu nur 4 % vorkommenden Introns. 274 intakte tRNA-Gene sind im gesamten Genom verteilt und treten als einzelne Transkriptionseinheiten auf. Die durchschnittliche Distanz zwischen zwei tRNA-Genen beträgt 45 kb, wobei die tRNA-Dichte auf jedem Chromosom variiert (Hani und Feldmann 1998). Vor allem um tRNA-Gene herum wurden Retrotransposons gefunden, welche einen Anteil von rund 2 % am Gesamtgenom von *S. cerevisiae* ausmachen (Kim *et al.* 1998).

1.2.1.1 Transposable Elemente in *Saccharomyces cerevisiae*

Das Genom der Bäckerhefe *S. cerevisiae* besitzt fünf unterschiedliche LTR-Retrotransposons, die als Ty1-Ty5 bezeichnet werden (siehe Abbildung 7). Ty1, Ty2, Ty4 und Ty5 sind Elemente der Ty1/copia-Gruppe (Boeke und Sandmeyer 1991, Kim *et al.* 1998).

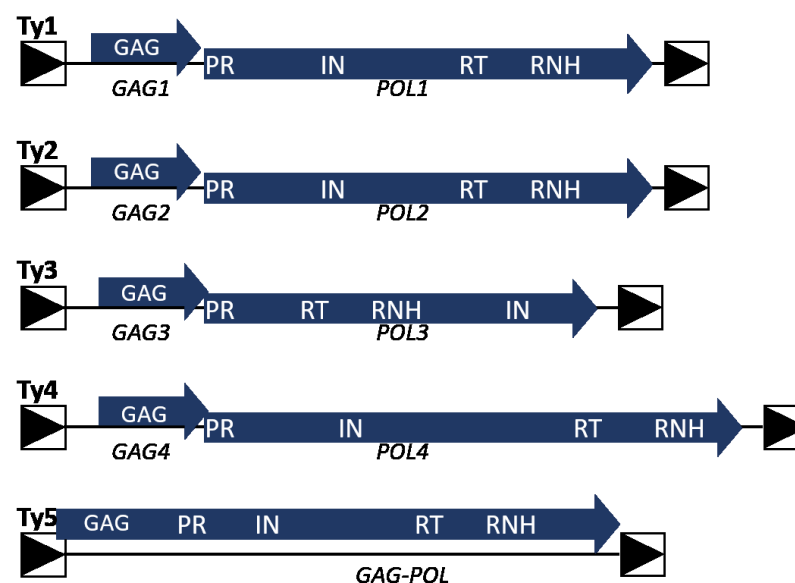


Abbildung 7: Strukturen der Ty-Elemente von *S. cerevisiae*

Schematische Darstellung der Ty1-Ty5-Elemente aus *S. cerevisiae*. Schwarze, terminale Dreiecke definieren die LTRs. GAG: *group specific antigen*, POL: Polyprotein mit PR: Protease, RT: Reverse Transkriptase, RNH: Ribonuklease-H, IN: Integrase. Abbildung modifiziert nach Krastanova *et al.* 2005

Ty3

Ty3 ist das einzige Element aus *S. cerevisiae* das in die LTR-Retrotransposon-Gruppe Ty3/gypsy eingeordnet wird und ist näher mit den Retroviren verwandt als der Rest der Ty-Elemente (Eickbush und Jamburuthugoda 2008, Hansen *et al.* 1988). Es ist 5351 bp lang, besteht aus zwei sich überlappenden ORFs, von denen einer das Gag-Protein (Gag), und der zweite für das Polyprotein (Pol) mit den jeweiligen Domänen Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT) mit Ribonuklease-H und Integrase (IN) codiert. Das Element wird zudem flankiert von zwei 340 bp langen LTR-Sequenzen in gleicher Richtung (*direct repeats*) (Clark *et al.* 1988, Sandmeyer *et al.* 2002). Das Ty3-Element besitzt eine Integrationspräferenz vor RNA-Polymerase III-transkribierte Gene. Anders als Ty1 (Ty2 und Ty4) integriert Ty3 sehr spezifisch ca. 15 bp vor tRNA-Gene (Chalker und Sandmeyer 1990, Chalker und Sandmeyer 1992, Sandmeyer *et al.* 1988). Dabei ist der Präinitiationskomplex der RNA-Polymerase III entscheidend für diese spezifische Integration. Ty3 interagiert mit Untereinheiten der Transkriptionsfaktoren TFIIC und TFIIB. Rekonstruktionen mit rekombinantem TFIIB zeigten *in vitro*, dass die Ty3-Integrase die Untereinheiten TBP und Brf1 benötigt, um zielgerichtet zu integrieren und dass Bdp1 die Integrationseffizienz verstärkt (Lin *et al.* 2001, Yieh *et al.* 2002, Yieh *et al.* 2000). Zudem bewirkt die Untereinheit Tfc1 aus TFIIC durch ihre Interaktion mit Ty3-IN, dass das Element in richtiger Orientierung in das Genom integriert (Chalker und Sandmeyer 1990, Yieh *et al.* 2002).

1.2.2 Die soziale Amöbe *Dictyostelium discoideum*

Die soziale Amöbe *Dictyostelium discoideum* ist ein Organismus, an dem innerhalb der letzten 80 Jahre fundamentale biologische Phänomene wie Zellbewegung, Zellentwicklung und interzelluläre Kommunikation untersucht wurde (Kessin 2001). *D. discoideum* wurde Anfang des 20. Jahrhunderts in den Wäldern North Carolinas entdeckt und als Isolat NC4 bezeichnet (Raper 1935). Der Organismus gehört phylogenetisch zu der Klasse der *Dictyostelia*, welche sich dadurch auszeichnen, dass sie sich aus einer vegetativen, einzelligen Phase bei Nahrungsmangel zu einem multizellulären Fruchtkörper entwickeln können. Die *Dictyostelia* werden in die Supergruppe der *Amoebozoa* eingegliedert (Schaap 2011). Diese bildet eine Schwestergruppe zu den *Opisthokonta*, den Tieren und Pilzen, und den *Archaeplastida*, zu denen auch die Landpflanzen gehören (Eichinger *et al.* 2005, Roger und Simpson 2009, Simpson und Roger 2004) (siehe Abbildung 8).

Anhand der unterschiedlichen Sporenformen und der verschiedenen Verzweigungstypen der Fruchtkörper wurden die *Dictyostelia* vorerst nur durch ihre morphologischen Merkmale klassifiziert (Raper und Rahn 1984). Erst durch die Sequenzierung der 18S-rDNA von über 100 *Dictyostelia*-Arten zeigte sich, dass die sozialen Amöben in 2 große Zweige (I und II) aufgeteilt werden können, die jeweils zwei Hauptgruppen beinhalten: Gruppe 1 und 2, sowie Gruppe 3 und 4 (Glöckner *et al.* 2016, Romeralo *et al.* 2013, Schaap *et al.* 2006) (siehe Abbildung 8). Phänotypische Analysen zeigen, dass sich diese Gruppen unterscheiden in: der Anzahl der unterschiedlichen Zelltypen, der Größe und Form der multizellulären Struktur, der Anwesenheit eines freien, sich bewegenden „Slug“-Stadiums und der Reaktion auf Licht (Romeralo *et al.* 2013, Schilde *et al.* 2014).

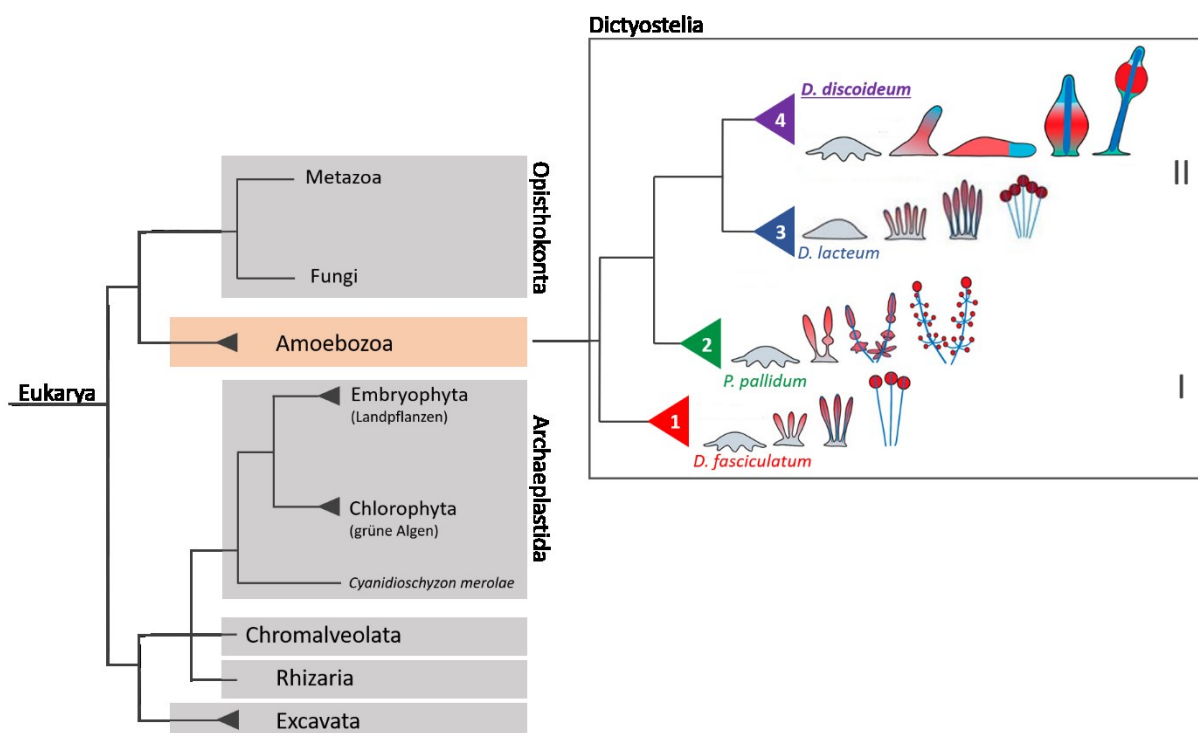


Abbildung 8: Vereinfachte Darstellung der Evolution der Eukaryoten und Darstellung der phylogenetischen Position von *D. discoideum*

Links: Vereinfachte Darstellung der Eukaryoten-Evolution. Die Supergruppe der *Amoebozoa* ist farblich hervorgehoben. Rechts: Einteilung der *Dictyostelia* in die vier Gruppen. Repräsentativ steht jeweils ein Vertreter mit Darstellung des jeweiligen Lebenszyklus.

Abbildung modifiziert nach Glöckner *et al.* 2016, Heidel *et al.* 2011, Zmasek und Godzik 2012.

Um aggregieren zu können nutzen die sozialen Amöben aus Gruppe 1, 2 und 3, mit den in Abbildung 8 repräsentativ dargestellten Organismen *Dictyostelium fasciculatum*, *Polyphosphondylium pallidum* und *Dictyostelium lacteum*, unterschiedliche sekretierte Signalmoleküle als Stimulus. Organismen der Gruppe 4, zu denen *D. discoideum* gehört, nutzen ausschließlich cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) als Stimulus zur Aggregation (Schaap *et al.* 2006).

Die 9-13 µm großen vegetativen Zellen von *D. discoideum* ernähren sich durch Phagozytose von Bakterien- oder Hefezellen innerhalb ihres Habitats. Sobald die Nahrungsquelle versiegt, wird von den Zellen pulsartig cAMP sezerniert. Benachbarte Zellen reagieren, wandern („streaming“) auf die Stelle mit der höchsten cAMP-Konzentration zu und sezernieren ihrerseits ebenfalls cAMP, um weiter entfernte Zellen zu erreichen (Schaap 2011). Daraus entsteht ein multizelluläres Aggregat aus ca. 100.000 Zellen. Dieses sogenannte Pseudoplasmodium geht in ein motiles „Slug“-Stadium über, welches, geschützt durch eine extrazelluläre Matrix, Umweltreize wie Temperatur, Licht, Feuchtigkeit und chemische Gradienten wahrnehmen kann und somit einen optimalen Standort für die Entwicklung des Fruchtkörpers ausfindig macht (Schaap 2011). Bereits in dieser Phase findet eine Differenzierung der Zelltypen statt. Dabei entwickeln sich 20 % der Zellen zu Prästielzellen und 80 % zu Präsporenzellen (Bonner 1952). Die Kulmination, die Bildung des Fruchtkörpers, beginnt mit der Ausbildung des „Mexican hat“ (Raper und Fennell 1952). Dabei flacht sich das Pseudoplasmodium durch die Migration der Prästielzellen zum Zentrum ab, woraufhin diese mit der Bildung des Stiels beginnen. Während dieses Prozesses vakuolisieren die Prästielzellen und sterben ab (Bonner und Lamont 2005). Gleichzeitig beginnen die Präsporenzellen an der Spitze mit der Differenzierung zu Sporen. Diese zeichnen sich durch die Bildung einer extrazellulären Schutzschicht aus Cellulose und Proteinen aus (West 2003). Die Entwicklung ist abgeschlossen nachdem sowohl Stiel als auch Sporen differenziert sind. Bei günstigen Umweltbedingungen können sich die Sporen schließlich wieder zu solitären Amöben entwickeln (siehe Abbildung 9).

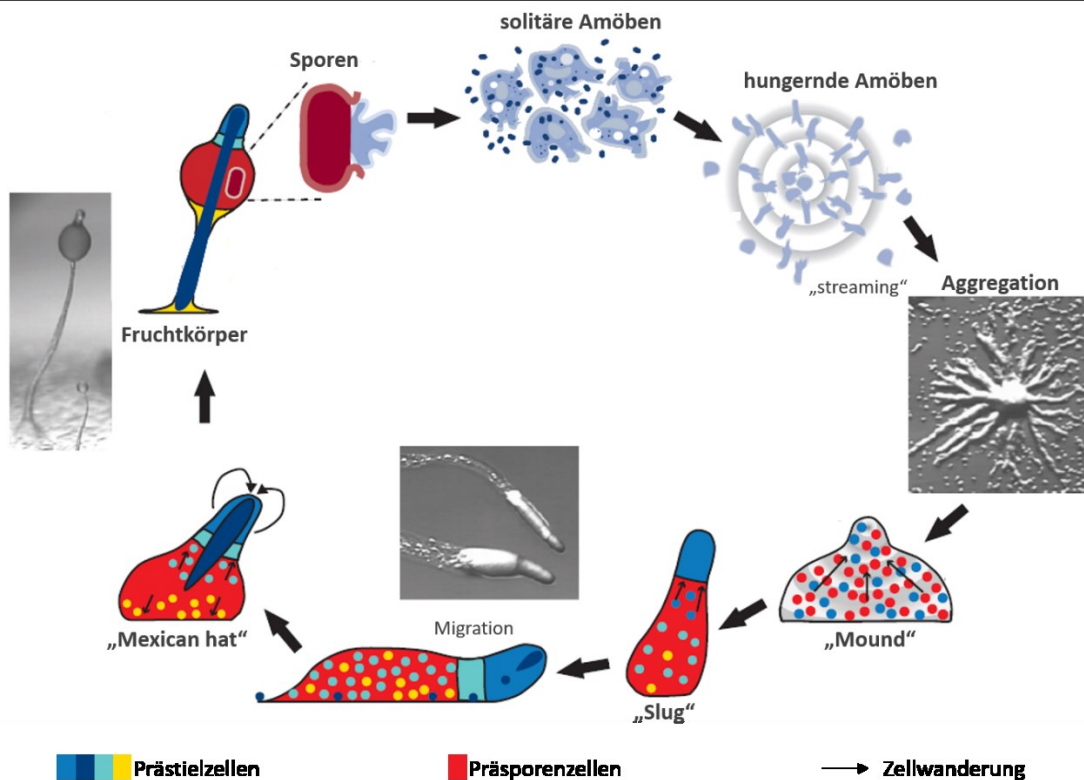


Abbildung 9: Lebenszyklus der sozialen Amöbe *Dictyostelium discoideum*

Beschreibung siehe Text. Die Abbildung wurde modifiziert nach Schaap 2011.

1.2.3 Das Genom von *Dictyostelium discoideum*

Das insgesamt 34 Mb große, haploide Genom von *D. discoideum* besteht aus sechs Chromosomen, die jeweils eine Größe von 4 bis 8 Mb aufweisen (Eichinger *et al.* 2005, Kuspa und Loomis 2006). Die Chromosomen bestehen in ihrer Centromerregion aus Clustern des Retrotransposons DIRS-1 während man in den Telomerbereichen Bruchstücke palindromischer rDNA-Einheiten findet (Eichinger *et al.* 2005). Das extrachromosomale Palindrom besteht aus zwei gespiegelten Armen, auf denen Kopien ribosomaler RNAs liegen (Eichinger *et al.* 2005, Heidel *et al.* 2011). Das Genom von *D. discoideum* enthält einen sehr hohen A/T-Gehalt (78 %) und besitzt nach aktuellem Kenntnisstand 11.987 Gene (dictybase.org). Durch die hohe Gendichte - ca. 65 % - liegen durchschnittlich nur ca. 1 kb nicht-codierende Sequenz zwischen zwei benachbarten Genen (Heidel *et al.* 2011). Die Gene haben eine durchschnittliche Länge von 1,6 kb und besitzen nur wenige Introns. Im Vergleich mit anderen Vertretern der sozialen Amöben fällt auf, dass die Anzahl der tRNA-Gene - 418 - in *D. discoideum* um einiges höher ist. (Eichinger *et al.* 2005, Heidel *et al.* 2011). Rund 10 % der genomischen DNA von *D. discoideum* besteht aus transposablen Elementen, welche entweder

in *Clustern* in Centromeren oder in der Nähe von tRNA-Genen auftreten (Glöckner *et al.* 2002, Glöckner *et al.* 2001, Spaller *et al.* 2016).

1.2.3.1 Transposable Elemente in *Dictyostelium discoideum*

Die Gruppe um Charles Zuker beschrieben 1983 das erste transposable Element in *D. discoideum*, dem in den anschließenden Jahren weitere Elemente folgten (Marschalek *et al.* 1989, Marschalek *et al.* 1992a, Szafranski *et al.* 1999, Zuker *et al.* 1983). Erst durch das Genomprojekt konnten weitere transposable Elemente in *D. discoideum* identifiziert und kategorisiert werden (Glöckner *et al.* 2001) (siehe Abbildung 10). Es wurde deutlich, dass die Elemente rund 10 % des gesamten *D. discoideum*-Genoms in Anspruch nehmen und dass der Großteil zu der Gruppe der Retrotransposons gehört, nur 1,5 % sind DNA-Transposon-ähnliche Elemente (Glöckner *et al.* 2001).

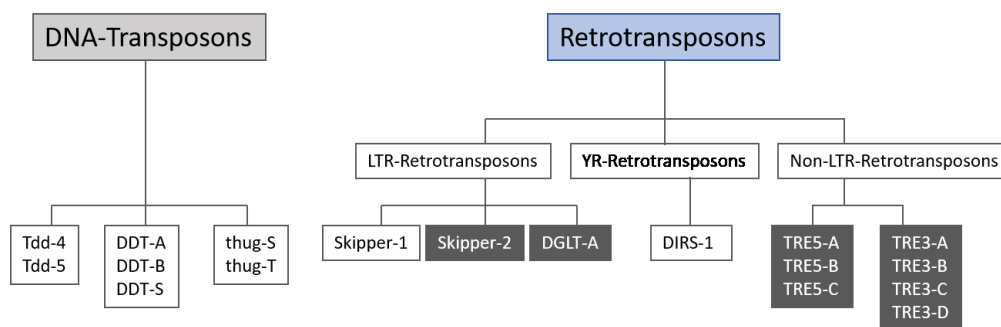


Abbildung 10: Überblick über die transposablen Elemente im Genom von *D. discoideum*

Darstellung aller bisher gefundenen mobilen Elemente im Genom von *D. discoideum*. Die Einteilung der DNA-Transposons ist hypothetisch, da diese keiner bisher bekannten Transposase ähneln. Die in graue Boxen eingefassten Elemente innerhalb der Retrotransposons integrieren zielgerichtet um tRNA-Gene herum. Abbildung modifiziert nach Winckler *et al.* 2011.

1.2.3.1.1 Non-LTR-Retrotransposons in *D. discoideum*

Die Non-LTR-Retrotransposons werden aufgrund ihrer Integrationspräferenz für tRNA-Gene als *tRNA-gene targeted retroelements* (TREs) bezeichnet (Szafranski *et al.* 1999). Man unterscheidet, je nach Integrationsort – vor (5′) oder hinter (3′) tRNA-Genen- zwischen den TRE5- und den TRE3-Elementen (siehe Abbildung 10).

TRE5-Elemente

Die TRE5-Elemente zeichnen sich durch ihre Integrationspräferenz ca. 50 bp oberhalb von tRNA-Genen aus (Winckler *et al.* 2005). Man unterscheidet zwischen drei Elementen (siehe Abbildung 11): TRE5-A, -B und -C. Wobei TRE5-A das erste Element im Genom von *D. discoideum* war, welchem eine Integrationsspezifität nachgewiesen wurde (Marschalek *et al.* 1989). Es zeigt mehrere strukturelle Variationen, weshalb man zudem zwischen TRE5-A.1, und den beiden nicht-autonomen Elementen TRE5-A.2 und -A.3 unterscheidet (Beck *et al.* 2002, Szafranski *et al.* 1999). TRE5-B und -C wurden erst im Zuge des *D. discoideum*-Genomprojektes entdeckt (Glöckner *et al.* 2001, Winckler *et al.* 2005). TRE5-C besitzt ein C-Modul in der 3'-UTR, wohingegen das B-Modul der UTR am 3'-Ende bei beiden Elementen fehlt (Szafranski *et al.* 1999, Winckler *et al.* 2002) (siehe Abbildung 11).

TRE3-Elemente

Die TRE3-Elemente besitzen eine Integrationspräferenz hinter tRNA-Genen. (Szafranski *et al.* 1999). Sie werden in TRE3-A, -B, -C und -D unterteilt, wobei alle Elemente nach dem gleichen Prinzip aufgebaut sind (Glöckner *et al.* 2001). Die Elemente besitzen zwei sich mit wenigen Basenpaaren überlappende ORFs, die gut konserviert sind. Einzig die flankierenden 5'- und 3'-UTRs zeigen einige Variationen untereinander (Winckler *et al.* 2002) (siehe Abbildung 11).

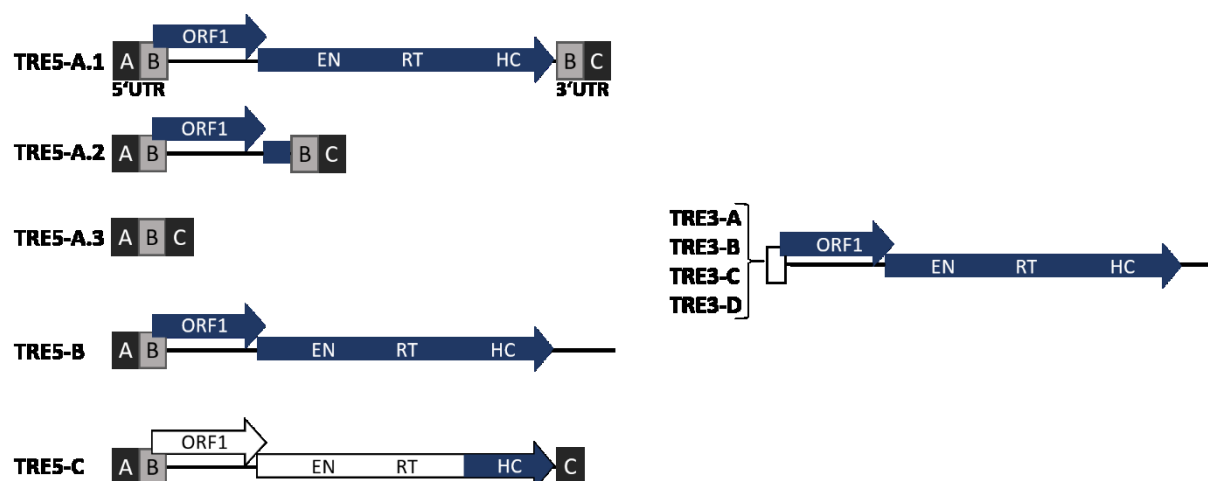


Abbildung 11: Schematische Darstellung der TRE-Elemente aus *D. discoideum*

Schematische Darstellung der unterschiedlichen TRE-Elemente in *D. discoideum*. EN: Endonuklease; RT: Reverse Transkriptase; HC: Cystein-reiche Region. Abbildung verändert nach Winckler *et al.* 2005.

1.2.3.1.2 YR-Retrotransposons

Die eukaryotischen Retrotransposons können, neben ihren zwei großen Gruppen Non-LTR- und LTR-Retrotransposons, zusätzlich in Penelope-ähnliche Retrotransposons und DIRS-ähnliche Retrotransposons eingeteilt werden (Jurka *et al.* 2007). Letztere definieren sich durch den Besitz einer Tyrosin-Rekombinase (YR) (Poulter und Goodwin 2005) und werden auch als YR-Retrotransposons bezeichnet.

DIRS-1

DIRS-1 (*Dictyostelium intermediate repeat sequence*) gehört zu den bisher am besten beschriebenen YR-Retrotransposons und ist mit einem Anteil von ca. 3,3 % am Gesamt-Genom das am häufigsten vertretene transposable Element in *D. discoideum* (Glöckner *et al.* 2001) (siehe Abbildung 12).

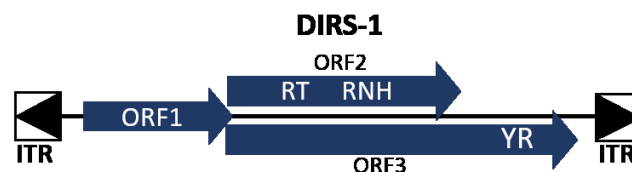


Abbildung 12: Schematische Darstellung des DIRS-1-Elements aus *D. discoideum*

Das Element besitzt invertierte terminale Sequenzwiederholungen (ITR) am 5'- und 3'-Ende und besteht aus drei ORFs. YR: Tyrosin-Rekombinase, RT: Reverse Transkriptase, RNH: Ribonuklease H.

Abbildung nach Spaller *et al.* 2016.

DIRS-1-Elemente integrieren präferiert in ihre eigenen existierenden genomischen Kopien. Dabei nutzen sie den durch die Tyrosin-Rekombinase vermittelten Mechanismus der homologen Rekombination (Cappello *et al.* 1984). DIRS-1 bildet daher große *Cluster* an den Chromosomenenden und in Bereichen der Centromere (Glöckner und Heidel 2009).

1.2.3.1.3 LTR-Retrotransposons in *D. discoideum*

Skipper-1

Das Skipper-1-Element ist mit ca. 50 kompletten Kopien und ca. 10 Solo-LTRs das am häufigsten vertretene Ty3/gypsy-LTR-Retrotransposon im Genom von *D. discoideum* (Eichinger *et al.* 2005, Glöckner *et al.* 2001). Es ist ca. 7 kb lang und besitzt zwei ORFs, welche von zwei identischen 390 bp langen LTRs in gleicher Orientierung flankiert werden (Leng *et al.* 1998) (siehe Abbildung 13). Die beiden ORFs codieren für LTR-Retrotransposon typische Domänen. ORF1 codiert für ein Gag-ähnliches-Protein, welches ein Zinkfinger-ähnliches-Motiv (CX₂CX₄CH₄) enthält. ORF2 codiert für ein Polyprotein mit den Protein-Domänen: Protease (PR), Reverse Transkriptase mit RNase-H (RT-RNH) und Integrase (IN), die an ihrer C-terminalen Verlängerung eine zusätzliche Chromodomäne (CHD) aufweist (Leng *et al.* 1998). Skipper-1 integriert ausschließlich in heterochromatische Bereiche, wie Centromere. Dort trägt es mit ca. 10 % zur Centromer-Gesamtlänge bei (Glöckner und Heidel 2009). Zudem ist die für die Ty3/gypsy-LTR-Elemente typische *primer binding site* (PBS) bei Skipper-1 durch eine Polypyrimidin-Sequenz (PPy) ausgetauscht (Spaller *et al.* 2016).



Abbildung 13: Schematische Darstellung des Skipper-1-Elements aus *D. discoideum*

Beschreibung siehe Text. PPu: Polypurin-Bindestelle. Abbildung nach Spaller *et al.* 2016.

Skipper-2

Das Skipper-2-Element besitzt Ähnlichkeiten zu den Elementen der Ty3/gypsy-Gruppe und wurde früher als DGLT-P-Element beschrieben (P für Pseudotransposon) (Glöckner *et al.* 2001). Alle genomischen Kopien dieses Elements sind degeneriert, das Element scheint jedoch eine ähnlich organisierte Struktur aufzuweisen wie Skipper-1. Zudem wurde festgestellt, dass auch Skipper-2 eine Chromodomäne im verlängerten Teil der Integrase besitzt, welche jedoch verglichen mit der Skipper-1-CHD verändert ist (Spaller *et al.* 2016). Skipper-2-Kopien befinden sich 8-23 bp hinter tRNA-Genen und zeigen somit einen anderen Integrationsort als Skipper-1 (Spaller *et al.* 2016).

DGLT-A

Neben den beiden LTR-Elementen DIRS-1 (Cappello *et al.* 1985) und Skipper-1 (Leng *et al.* 1998) wurde 1991 von Hofmann *et al.* ein kurzes repetitives DNA-Element im Genom von *D. discoideum* gefunden, welches ca. 30 bp vor tRNA-Genen lag und vorerst als H3R-(*Hind3-repeat*)-Element bezeichnet wurde (Hofmann *et al.* 1991). Die 268 bp lange H3R-Sequenz zeigte die terminalen Dinukleotide 5'-TG.....CA-3', welche als typisches LTR-Motiv in Retrotransposons auftritt (Boeke und Chapman 1991). Es wurde daher spekuliert, dass das H3R-Element ein LTR eines weiteren, noch unbekannten Retrotransposons ist (Winckler 1998), was 2001 durch Glöckner *et al.* bestätigt wurde. Das auf Basis von RT-Sequenzvergleichen zu der Ty3/gypsy-Gruppe gehörende Element wurde seither als „*Dictyostelium Gypsy-like Transposon Subtype A*“ (DGLT-A) bezeichnet (Glöckner *et al.* 2001).

DGLT-A ist 5054 bp lang und besteht, im Gegensatz zu allen anderen LTR-Retrotransposons, aus nur einem ORF, der für ein 1437 Aminosäuren langes Polyprotein codiert, welches aus einem Gag-Teil und einem Pol-Teil besteht (Glöckner *et al.* 2001, Winckler *et al.* 2002). Der Gag-Teil besitzt zwar keine Ähnlichkeit zu anderen Retrotransposons oder Retroviren, beinhaltet jedoch ein Zinkfinger-ähnliches Motiv (CX₂CX₄HX₄C) und kann aufgrund seiner Position im Polyprotein (Aminosäuren 2-236) durchaus als Retrovirus-ähnliche Gag-Domäne bezeichnet werden (Schiefner 2014). Der Pol-Teil des einzigen ORFs enthält eine Protease- (Aminosäurenposition 231-426), eine Reverse Transkriptase (Aminosäurenposition 419-742) mit Ribonuklease H- (Aminosäurenposition 733-879) und eine Integrase-Domäne (Aminosäurenposition 994-1437) (siehe Abbildung 14). Das DTGS-Motiv mit einem katalytischen Aspartat innerhalb der Protease-Domäne deutet auf eine retrovirale, Pepsin-ähnliche Aspartatprotease hin. Die Integrase-Domäne kann zudem in drei Teile aufgeteilt werden: die N-terminale Domäne (NTD) mit Zinkfinger-ähnlichem Motiv, die CCD (*catalytic core domain*) mit dem DD(35)E-Motiv und die C-terminale Domäne (CTD), welche ein charakteristisches GPY/F-Motiv beinhaltet (Glöckner *et al.* 2001). Der einzige ORF des Elements wird von zwei LTRs (H3Rs) flankiert, welche auch einzeln, als sogenannte Solo-LTRs, im Genom von *D. discoideum* auftreten und wahrscheinlich das Ergebnis von Rekombinationsereignissen sind. Innerhalb des *D. discoideum*-Genoms existieren 15 solcher Solo-LTRs und nur wenige Kopien von DGLT-A-Elementen, die jedoch allesamt unvollständig sind (Glöckner *et al.* 2001). Die zusätzlichen Mutationen lassen vermuten, dass die Elemente

nicht mehr im Genom von *D. discoideum* aktiv sind (Winckler *et al.* 2005).

Genomanalysen zeigten, dass 18 von 20 DGLT-A-Insertionen in einem Integrationsfenster von 13-18 bp vor tRNA-Genen lokalisiert sind (Spaller *et al.* 2016). Diese Integrationspräferenz ist auffallend ähnlich zu der von Ty3, dem LTR-Retrotransposon aus der Bäckerhefe *S. cerevisiae* (Chalker und Sandmeyer 1992) (siehe Abschnitt 1.2.1.1).

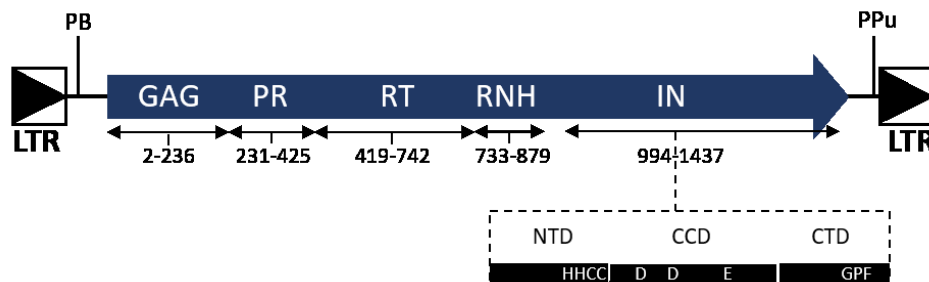


Abbildung 14: Schematische Darstellung des DGLT-A-Elements aus *D. discoideum*

GAG: *group specific antigen*; PR: Protease; RT: Reverse Transkriptase; RNH: Ribonuklease H; IN: Integrase; NTD: N-terminale Domäne; CCD: *catalytic core domain*; CTD: C-terminale Domäne; PB: tRNA-Primer-Bindestelle; PPU: Polypurin-Bindestelle

1.3 Integrationen von transposablen Elementen

1.3.1 Das Wechselspiel zwischen Wirt und transposablen Elementen

Die Tatsache, dass in fast allen eukaryotischen Genomen transposable Elemente vertreten sind, die oftmals sogar einen großen genomischen Anteil einnehmen können, lässt vermuten, dass diese nicht nur als *selfish*-DNA oder molekulare Parasiten agieren, sondern auch Auswirkungen auf die Zelle bzw. den Wirt haben können. Durch ihre Vielfalt und der Fähigkeit zur Transposition können sie die Expression von Wirtsgenen beeinflussen (Slotkin und Martienssen 2007), Chromosomeninversionen oder -deletionen fördern, die Transkription einzelner Gene regulieren oder gar zerstören, sowie Genmutationen, DNA-*Shuffling* und Rekombinationen verursachen (Ayarpadikannan und Kim 2014, Huang *et al.* 2012, Judd und Feschotte 2018, Kazazian 2004). Somit haben die transposablen Elemente einen signifikanten Einfluss auf die Genomevolution ihrer Wirte (Gbadegesin 2012). Es sind Beispiele bekannt, in denen sich sogar neue Gene direkt aus transposablen Elementen entwickelten. So konnte durch Sequenzvergleiche gezeigt werden, dass die Telomerase, die durch reverse

Transkription die Chromosomenenden (Telomere) während der Zellteilung verlängert, das Ergebnis einer Domestikation der Reversen Transkriptase von Non-LTR-Retrotransposons ist (Eickbush 1997). Bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* werden die Telomere sogar direkt von Non-LTR-Retrotransposons verlängert und stabilisiert (Pardue und DeBaryshe 2003). Die *RAG1*- und *RAG2*-Gene, deren Produkte an der V(D)J-Rekombination der Antikörper-Gene beteiligt sind, sind ebenfalls das Ergebnis von domestizierten transposablen Elementen (Agrawal *et al.* 1998).

Die Anwesenheit und Transposition von mobilen Elementen innerhalb des Genoms kann sich jedoch auch negativ auf den Wirt auswirken. So können beispielsweise ca. 0,27 % aller mutationsbedingten Erkrankungen des Menschen auf Integrationen von transposablen Elementen zurückgeführt werden (Kaer und Speek 2013). Es bedarf daher regulierender Mechanismen, die in der Lage sind eine Transposon-Wirt-Koexistenz im Laufe der Evolution erhalten zu können. Auf Seiten des Wirtes können nachteilige TE-Integrationen durch Abwehrmechanismen wie der RNA-Interferenz (Buchon und Vaury 2006, Castel und Martienssen 2013), aber auch durch epigenetische Mechanismen – wie der Methylierung von genomischer DNA - eliminiert werden (Barlow 1993, Yoder *et al.* 1997).

Einige transposable Elemente haben daher die Strategie der zielgerichteten Integration entwickelt, durch die bei der Transposition der Elemente der Wirt mit keiner ihm unmittelbar schadenden Konsequenz rechnen muss. Die gezielte Integration in intergenische- oder transkriptionsinaktive Bereiche gewährleistet somit eine Art Gleichgewichtszustand zwischen Transposon und Wirt und resultiert in der Domestikation der Elemente im Wirtsgenom (Malicki *et al.* 2017, Oliver und Greene 2009).

1.3.2 Zielgerichtete Integration von transposablen Elementen

Die Verteilung von transposablen Elementen in Genomen ist nicht willkürlich. Vielmehr ist zu beobachten, dass transposable Elemente in spezifischen Regionen ihres Wirts-Genoms akkumulieren und dabei Transposon-spezifische und Wirts-spezifische Muster zeigen (Sultana *et al.* 2017). Die vielfältigen molekularen Mechanismen, die den transposablen Elementen zur Identifikation ihrer spezifischen Integrationsorte dienen, aber auch der Integrationsort selbst, werden im Folgenden anhand einiger Beispiele intensiver aufgezeigt. Die für ihre eigens zur Transposition benötigten, codierten Enzyme von DNA-Transposons, LTR- und Non-LTR-Retrotransposons, spielen dabei eine Schlüsselrolle.

So erkennen beispielsweise die Non-LTR-Retrotransposons L1 und R1 ihre Integrationsziele, indem ihre Endonuklease in der Lage ist, spezifische DNA-Bereiche zu identifizieren. Das humane L1-Retrotransposon erkennt lokale, AT-reiche DNA-Strukturen und nutzt einen *Poly-Thymidin-Stretch* um das RNA-Intermediat mit seiner Poly(A)-Sequenz am 3'-Ende komplementär an die DNA zu binden (Han 2010, Repanas *et al.* 2007) (siehe Abschnitt 1.1.2.1.1). Das RNA-3'-Ende des aus einem ORF bestehenden R1-Elements aus dem Insekt *Bombyx mori*, besitzt hingegen eine ortsspezifische Sequenz, welche dem Element eine Integration in rRNA-Gene ermöglicht (Anzai *et al.* 2005, Jamburuthugoda und Eickbush 2014, Luan *et al.* 1993, Xiong und Eickbush 1988) (siehe Abbildung 15).

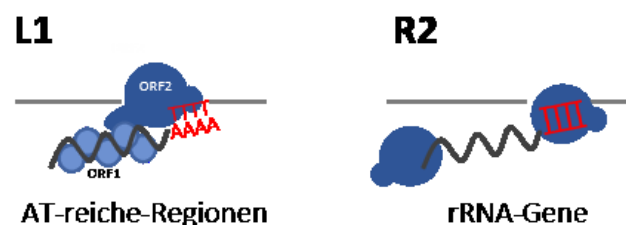


Abbildung 15: Integrationspräferenz der Non-LTR-Retrotransposons L1 und R2

Links: Präintegrationskomplex (PIC) des humanen L1-Elements, welches in AT-reiche Regionen integriert (rot). Rechts: PIC des R2-Elements aus *Bombyx mori*. Das R2-Element besteht aus nur einem ORF, der für ein Protein mit reverser Transkriptionsaktivität und einer Restriktionsenzym-ähnlichen Domäne codiert (blaue Kreise). Durch die ortsspezifische Sequenz (rot) am 3'-Ende der RNA (grau) findet dieses Element rRNA-Gene.

Modifiziert nach Sultana *et al.* 2017 und Jamburuthugoda und Eickbush 2014.

Neben der direkten Erkennung von DNA-Bereichen, gehen andere transposable Elemente für eine spezifische Integration Interaktionen mit Wirts-Proteinen ein. Dabei interagiert der Präintegrationskomplex (PIC) des Transposons mit wirtseigenen DNA- oder Chromatin-bindenden-Proteinen und wird dadurch an den vorgesehenen Integrationsort „gezogen“. Dieses sogenannte *tethering-model* wurde erstmals 1990 postuliert (Sandmeyer *et al.* 1990) und ist durch die Analyse zahlreicher Interaktionen zwischen Wirt und Transposons oder Retroviren, bis heute weiterhin bestätigt. Viele Beispiele sind mittlerweile bekannt, in denen besonders die Integrase von Retrotransposons eine wichtige Rolle bei der ortsspezifischen Integration spielt. Beispielsweise interagiert die Integrase von Tf1, ein LTR-Retrotransposon aus *Schizosaccharomyces pombe*, mit dem *switch-activating protein 1*

(Sap1), einem essenziellen DNA-binde-Protein während der Replikation der DNA. Tf1 integriert somit, durch die Nukleosomen-freien Bereiche während der Replikation, spezifisch in Promotoren von RNA-Polymerase II transkribierten, stress-induzierten Genen (Cherry *et al.* 2012, Guo und Levin 2010, Hickey *et al.* 2015, Jacobs *et al.* 2015) und kann dadurch auch selbst verstärkt exprimiert werden (Capy *et al.* 2000, Feng *et al.* 2013) (siehe Abbildung 16). Hefe-Zwei-Hybrid-Experimente lassen vermuten, dass zudem die RT-RNH in den Präintegrationskomplex von Tf1 involviert ist (Steele und Levin 1998). Ebenfalls in die Promotoren von RNA-Polymerase II-transkribierenden Gene integriert das im Genom des Schmetterlings *Trichoplusia ni* vorkommende DNA-Transposon PiggyBac. Dabei interagiert die PiggyBac-Transposase mit BET-(*bromodomain and extra-terminal*)-Proteinen (Gogol-Döring *et al.* 2016) (siehe Abbildung 16).

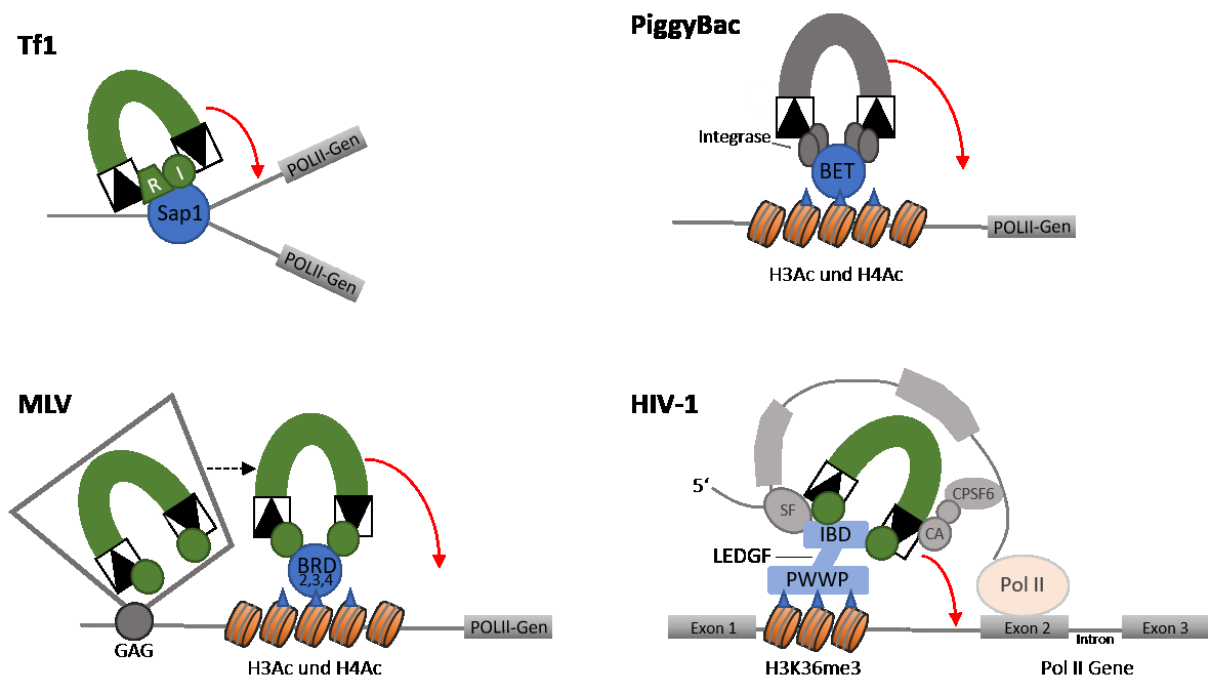


Abbildung 16: Integrationspräferenz von transposablen Elementen vor RNA-Pol II transkribierte Gene

Tf1-Element aus *S. pombe* interagiert mit seiner Integrase (I) und Sap1 (blau) während der Replikation und integrieren vor POL II-Gene. Die RNH (R) des Elements scheint auch im PIC vertreten zu sein. Das DNA-Retrotransposon **PiggyBac** aus *Trichoplusia ni* integriert vor POL II-Gene und geht dafür eine Interaktion mit seiner Integrase und BET (blauer Kreis) ein, welches H3Ac und H4Ac (blaue Dreiecke) identifizieren kann. Das Gag-Protein des Retrovirus **MLV** zieht den PIC (grauer Kasten) in kondensiertes Chromatin während der Mitose. Durch die Auflösung des PIC kann MLV mit BRD-Proteinen (blauer Kreis) interagieren, welche acetyliertes H3 und H4 identifizieren können. Das **HIV**-Kapsid (CA) interagiert mit dem Präintegrationskomplex und dem alternativen *Poly-Adenylation*-Komplex, der CPSF6 (grau) beinhaltet. Dieser kann HIV in transkriptionsaktives Chromatin führen, wohingegen der LEDGF (hellblau) für die Integration vor POL II transkribierte Gene verantwortlich ist. SF: *Splicing factor*, orange-farbene Zylinder: Nukleosomen-Darstellung. Modifiziert nach Sultana *et al.* 2017.

Eine ähnliche Interaktion wurde bei dem MLV-(*murine leukemia virus*)-Retrovirus festgestellt. Die Integrase des Retrovirus interagiert dabei mit den BET-Proteinen BRD2, BRD3 und BRD4 (Gupta *et al.* 2013). Dabei sind die Bromodomänen in der Lage die acetylierten Histone H3 und H4 zu erkennen, welche oft Promotor- oder *Enhancer*-Regionen von RNA-Polymerase II-transkribierten Genen markieren (LaFave *et al.* 2014, Larue *et al.* 2014).

Ebenfalls an Histonmodifikationen orientiert sich das Humane Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1). Das Retrovirus HIV-1 bindet an IBD (*Integrase binding domain*) am C-Terminus des LEDGF (*lens epithelium-derived growth factor*), welcher über sein PWWP-Motiv am N-Terminus die H3K36me3-Modifikation erkennt und HIV-1 in einen Bereich hoher Transkriptionsaktivität leitet (Cherepanov *et al.* 2003, Llano *et al.* 2006, Sultana *et al.* 2017) (siehe Abbildung 16).

Die transposablen Element sind somit in der Lage, ihre spezifischen Integrationsorte im Genom über direkte Sequenzmotive auf der DNA oder spezielle Interaktionen zwischen den eigenen und den Wirtsproteinen zu identifizieren. Ein weiterer von transposablen Elementen genutzter Integrationsort ist das transkriptionsinaktive Heterochromatin (Gao *et al.* 2015, Levis *et al.* 1993).

1.3.3 Heterochromatin als Integrationsziel

Heterochromatin ist ein großer Bestandteil im Nukleus der Eukaryoten und ist essenziell für die Instandhaltung der genomischen Stabilität. Vor allem in den Telomeren und pericentromeren Bereichen tritt das konstitutive Heterochromatin in konzentrierter Form auf und ist dort angereichert mit repetitiven Sequenzen, zu denen neben Satelliten-DNA und ribosomaler DNA auch Transposons zählen (Janssen *et al.* 2018). Im Heterochromatin findet man, wie auch im Euchromatin, die zur DNA-Verpackung notwendigen Histon-Proteine H1, H2A, H2B, H3 und H4, die durch kovalente Modifikationen spezifischer Aminosäuren die Chromatinstruktur zeitlich und räumlich beeinflussen (Strahl und Allis 2000). Die bekannteste Heterochromatin-Modifikation ist die Methylierung von Lysin 9 an Histon H3 (H3K9), wobei Lysin mit einer (me), zwei (me2) oder drei Methylgruppen (me3) versehen werden kann (Wu *et al.* 2005). Um die durch spezifische Modifikationsenzyme gesetzten Modifikationen an den jeweiligen Histonen lesen, interpretieren und unterscheiden zu können, bedarf es Proteine mit spezialisierten Domänen (Taverna *et al.* 2007). So kommen allein für die Erkennung von methyliertem Lysin die Tudor-, MBT- und Chromodomäne in Frage, wobei letztere am

bekanntesten ist (Bottomley 2004). Die Chromodomäne ist zum Beispiel ein Bestandteil des Heterochromatin-Protein 1 (HP1), welches zur heterochromatischen Verpackung der DNA beiträgt, jedoch auch eine Rolle beim Schutz der Chromosomenenden, bei der DNA-Replikation und -Reparatur spielt (Dinant und Luijsterburg 2009, Hayashi *et al.* 2009, Perrini *et al.* 2004, Zarebski *et al.* 2009). Der spezielle Aufbau dieses Proteins ermöglicht eine Vielfalt unterschiedlicher Funktionen. Die N-terminale Chromodomäne (CHD) erkennt die H3K9-Methylierung (Bannister *et al.* 2001, Lachner *et al.* 2001), die C-terminale *Chromoshadow*-Domäne (CSD) dient als Interaktionsmodul für weitere Chromatinkomponenten und als Bindungsstelle zur HP1-Dimerisierung. Die sogenannte „Hinge-Region“, als flexibler Linker, verbindet beide Domänen miteinander (Lomberg *et al.* 2006).

Auch Transposons und Retroviren nutzen Chromatinmodifikationen als Erkennungssignal für zielgerichtete Integration. Manche Chromoviren, die zu der Gruppe der Ty3/Gypsy-LTR-Retrotransposons gehören, finden die für Heterochromatin typische Modifikation H3K9me2 oder H3K9me3. So wird beispielsweise das Chromovirus MAGGY aus dem Pilz *Magnaporthe grisea* durch seine Integrase, welche eine Chromodomäne beinhaltet, zielgerichtet in Heterochromatin geleitet (Sultana *et al.* 2017). Das Ty5-Element aus *S. cerevisiae* integriert ebenfalls in Heterochromatin, jedoch findet hier eine Interaktion zwischen dem *heterochromatin protein silent information regulator 4* (Sir4) und der Integrase des Retrotransposons statt (Gai und Voytas 1998, Xie *et al.* 2001) (siehe Abbildung 17).

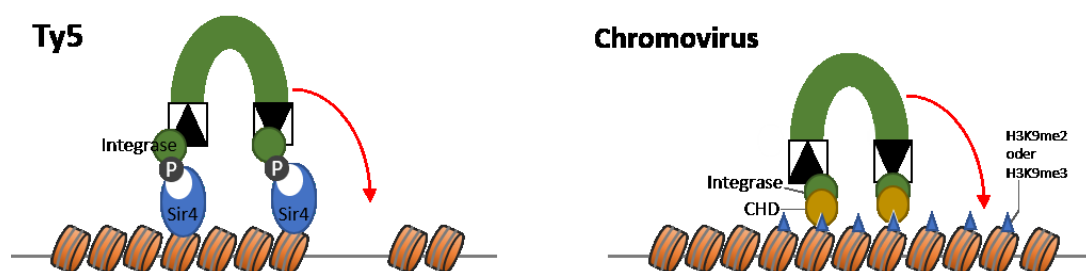


Abbildung 17: Integrationspräferenz von Ty5 aus *S. cerevisiae* und Chromoviren

Links: Zielgerichtete Integration (roter Pfeil) des LTR-Retrotransposons Ty5 (grün) aus *S. cerevisiae*. Das Element interagiert mit Sir4 (blau) und erkennt dadurch heterochromatische Bereiche. Rechts: Integration eines Chromovirus in Heterochromatin (roter Pfeil). Die Chromodomäne (gelb) erkennt dabei methyliertes H3K9 (blaue spitzen). Orange-farbene Zylinder: schematische Darstellung von Nukleosomen.

Abbildung modifiziert nach Sultana *et al.* 2017.

1.3.4 tRNA-Gene als Integrationsziel

Einige transposable Elemente wählen die Bereiche um tRNA-Gene herum, um spezifisch und sicher integrieren zu können. Die 76-97 bp kleinen tRNA-Gene kommen ubiquitär und oftmals zu mehreren hundert Kopien in Genomen vor und werden bei Eukaryoten von der RNA-Polymerase III transkribiert (Barciszewska *et al.* 2016).

1.3.4.1 Der RNA-Polymerase III-Präinitiationskomplex

Die RNA-Polymerase III (POLIII) setzt sich aus 17 Untereinheiten zusammen und transkribiert sowohl alle tRNAs als auch andere essenzielle RNAs einschließlich der U6 snRNA (*small nuclear RNA*) und der 5S-rRNA-Gene. Dafür benötigt sie die Transkriptionsfaktor-Komplexe TFIIIA, TFIIIB und TFIIIC (Acker *et al.* 2013, Turowski und Tollervey 2016). Die Transkription von tRNA-Genen wird durch TFIIIB und TFIIIC reguliert (Geidushek und Tocchini-Valentini 1988). Dabei erkennt TFIIIC zuerst die hoch konservierten internen Promotorsequenzen der tRNA-Gene und rekrutiert den Transkriptionsfaktor-Komplex TFIIIB, welcher die anschließende Bindung der POLIII und den Start der Transkription einleitet (Kassavetis *et al.* 1990).

Der interne Promotor der tRNA-Gene besteht aus einer vorderen A-Box und einer hinteren B-Box, an den der Transkriptionsfaktor TFIIIC bindet (siehe Abbildung 18). Analog zu dem humanen Transkriptionsfaktor TFIIIC setzt sich auch der aus *S. cerevisiae* aus sechs Untereinheiten zusammen (Tfc1, Tfc3, Tfc4, Tfc6, Tfc7 und Tfc8), die nochmals in zwei große Subkomplexe, τ A und τ B aufgeteilt werden können (Ducrot *et al.* 2006, Male *et al.* 2015). τ B besteht aus Tfc3 (auch τ 138 genannt), Tfc6 (τ 91) und Tfc8 (τ 60) und bindet gemäß seinem Namen an die B-Box der tRNA-Gene (Geidushek und Kassavetis 2001).

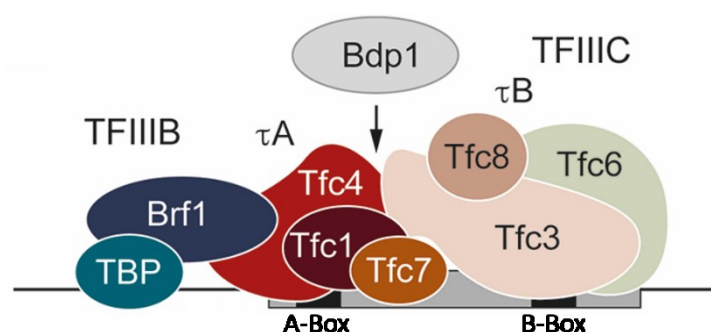


Abbildung 18: Präinitiationskomplex der RNA-Polymerase III an tRNA-Genen

Beschreibung siehe Text. Abbildung modifiziert nach Spaller *et al.* 2016

Durch die Bindung der TFIIIC-Untereinheit Tfc3 an das tRNA-B-Box-Motiv startet die Assemblierung des POLIII-Präinitiationskomplexes (Baker *et al.* 1986). Der TFIIIC-Komplex ist komplett, nachdem auch Subkomplex τ A, welcher aus den TFIIIC-Untereinheiten Tfc1 (τ 95), Tfc4 (τ 131) und Tfc7 (τ 55) zusammengesetzt ist, an die A-Box gebunden hat (Ducrot *et al.* 2006). Daraufhin wird der Transkriptionsfaktor-Komplex TFIIIB rekrutiert (Kassavetis *et al.* 1990). TFIIIB ist ein Trimer aus dem TATA-Bindeprotein (TBP), dem TFIIIB-related factor 1 (Brf1) und TFIIIB double prime (Bdp1). Die beiden Proteine TBP und Brf1 binden mit hoher Affinität aneinander und bilden den sogenannten B'-Komplex, wobei Bdp1 sich nur vorübergehend dem Präinitiationskomplex anschließt, um die Rekrutierung der POLIII zu unterstützen (Male *et al.* 2015, Moir und Willis 2004) (siehe Abbildung 18).

Ein Mediator zwischen DNA-gebundenem TFIIIC und TFIIIB ist der TFIIIC-Transkriptionsfaktor Tfc4. Dabei startet die Interaktion zwischen Tfc4 und TFIIIB-Transkriptionsfaktor Brf1 die Assemblierung des Transkriptionsfaktor-Komplexes TFIIIB (Chaussivert *et al.* 1995, Dumay-Odelot *et al.* 2002, Liao *et al.* 2006, Liao *et al.* 2003, Moir *et al.* 2000). Die Bindung des zweiten TFIIIB-Transkriptionsfaktors TBP resultiert aus der Interaktion von Brf1 und dem DNA-gebundenen TFIIIC. Das anschließend an den TBP/Brf1-TFIIIC-DNA-Komplex bindende Bdp1 geht ebenfalls eine Bindung mit TFIIIC-Tfc4 ein. Dafür führt der Brf1-Tfc4-Komplex eine Konformationsänderung aus und Bdp1 kann zusätzlich an das zentrale TPR-Array von Tfc4 binden (Dumay-Odelot *et al.* 2002, Liao *et al.* 2003, Rozenfeld und Thuriaux 2001, Ruth *et al.* 1996). Durch das neu gebundene Bdp1 an Tfc4, und die Initiation der Transkription durch die POLIII, wird die vorherige Bindung von Tfc3 aufgehoben und der τ B-Komplex aus dem POLIII-Präinitiationskomplex letztendlich verdrängt (Male *et al.* 2015). Die Transkriptionsfaktor-Komplexe TFIIIB und TFIIIC existieren auch in *D. discoideum*. Dabei besteht TFIIIB ebenfalls aus den drei Proteinen TBP, Brf1 und Bdp1. Während Bdp1 eine geringe Homologie zu den Orthologen von Mensch und *S. cerevisiae* zeigt, ist das TBP-Protein bei beiden zu ca. 68 % identisch. Zudem konnte *in vitro* eine TBP-Brf1-Interaktion, ähnlich der zu *S. cerevisiae*, nachgewiesen werden (Chung *et al.* 2007). TFIIIC kommt in *D. discoideum* ebenfalls als Multiproteinkomplex vor. Bisher konnte jedoch nur eine Bindung des Komplexes an die B-Box der tRNA-Gene biochemisch nachgewiesen werden (Bukenberg *et al.* 1994), denn eine Identifizierung der Gensequenzen von TFIIIC-Untereinheiten in *D. discoideum* aufgrund von Sequenzhomologien zu orthologen Proteinen anderer Spezies gestaltet sich schwierig (siehe Ergebnisteil).

1.3.4.2 tRNA-Gene im Genom von *Dictyostelium discoideum*

Im Genom von *D. discoideum* wurden bisher 418 tRNA-Gen-Kopien identifiziert (siehe <http://dictybase.org/>), die homogen im Genom verteilt sind und von denen überdurchschnittlich viele Gene als tandemartige Verdopplung auftreten (Eichinger *et al.* 2005, Winckler *et al.* 2005). Die tRNA-Gene bestehen aus einer internen Promotorregion, der A-Box (Position 8-19) und der B-Box (Position 53-61) und folgen damit der allgemeinen Architektur von Typ-III-transkribierten POL III-Genen. Eine Besonderheit stellen die bei 66 % der tRNA-Genen auftretenden externen B-Box-Motive dar (exB), die sich 19-35 bp unterhalb der internen B-Box befindet (Hofmann *et al.* 1991, Siol *et al.* 2006) (siehe Abbildung 19). Sie entsprechen dem B-Box-Konsensus der internen B-Box-Motive und sind möglicherweise in der Lage, dem Transkriptionsfaktor-Komplex der POLIII, TFIIIC, eine Art „Parkmöglichkeit“ während der Transkription zu gewähren (Siol *et al.* 2006). Die internen B-Boxen der tRNA-Gene von *D. discoideum* sind stark konserviert und entsprechen den typischen eukaryotischen Motiven. Das Motiv GTCnnnnG⁵³TTCRAnYC ist nur in tRNA-Genen von *D. discoideum* zu finden (Siol *et al.* 2006).

Rund 54 % aller tRNA-Gene im Genom von *D. discoideum* sind mit Retrotransposons assoziiert (Winckler *et al.* 2005). Dabei nutzen vier verschiedene Retrotransposons die Bereiche um tRNA-Gene als sicheren Integrationsort (Spaller *et al.* 2016). Einzig der Mechanismus der dem Non-LTR-Retrotransposon TRE5-A zur Identifizierung von Integrationszielen dient, ist bisher genauer untersucht. Das Orf1-Protein des Retrotransposons interagiert hier mit den drei Proteinen TBP, Brf1 und Bdp1 des TFIIIB-Komplexes und integriert ca. 50 bp vor tRNA-Gene (Chung *et al.* 2007) (siehe Abbildung 19). Von dem Non-LTR-Retrotransposons TRE3 ist bekannt, dass es ca. 100 bp hinter tRNA-Genen integriert (Szafranski *et al.* 1999). Es wird vermutet, dass TRE3 eine Interaktion mit dem an der B-Box gebundenen TFIIIC-Komplex eingeht, da TRE3-Integrationen sowohl hinter der internen als auch hinter der externen B-Box existieren (Bukenberg *et al.* 1994, Bukenberg *et al.* 1991, Winckler 1998).

Die LTR-Retrotransposons Skipper-2 und DGLT-A zeigen ebenfalls Integrationspräferenzen hinter und vor tRNA-Genen. Skipper-2 integriert 8-23 bp hinter tRNA-Genen (Spaller *et al.* 2016). DGLT-A hingegen integriert ca. 15 bp vor tRNA-Genen und wählt somit den gleichen Integrationsort wie Ty3 aus *S. cerevisiae* (Glöckner *et al.* 2001, Sandmeyer *et al.* 1988) (siehe Abbildung 19).

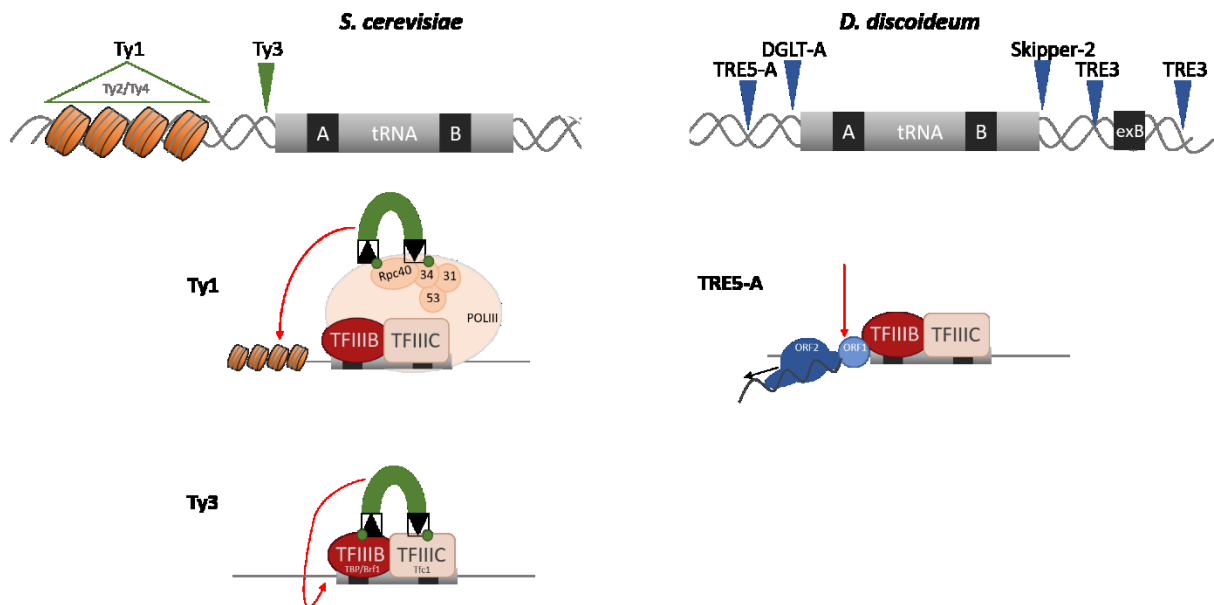


Abbildung 19: Integrationspräferenzen der mobilen Elemente aus *S. cerevisiae* und *D. discoideum*

Links: Darstellung der Integrationspräferenz von Ty1 und Ty3 aus *S. cerevisiae*. **Ty1** transponiert in ein Integrationsfenster zwischen 75-750 bp vor tRNA-Genen, es interagiert mit den Untereinheiten Rpc40, Rpc31, Rpc34 und Rpc53 der RNA-Polymerase III und der Nukleosomen-Oberfläche an der H2A/H2B-Stelle. **Ty3** geht eine Interaktion mit dem Präinitiationskomplex der RNA-Polymerase III ein. Es interagieren die Proteine TBP und Brf1 des Transkriptionsfaktor-Komplexes TFIIB und Tfc1 aus TFIIC mit der Integrase des Elements und positionieren dieses dadurch ca. 15 bp vor tRNA-Gene. Grüne Kreise: schematische Darstellung der Integrase-Proteine, grüne Dreiecke: Integrationsorte der jeweiligen Transposons im Genom.

Rechts: Integrationspräferenzen von TRE5-A, DGLT-A, Skipper-2 und TRE3 aus *D. discoideum*. Die Interaktionen zwischen Retrotransposon-Proteinen und Wirts-Proteinen ist für TRE5-A genauer aufgezeigt. Alle dargestellten Retrotransposons integrieren um tRNA-Gene herum. *D. discoideum* besitzt zudem ein externes B-Box-Motiv (exB).

Rote Pfeile: Integrationsort im Genom, orang- farbene Zylinder: schematisch dargestellte Nukleosomen, tRNA-Gene: graue Balken mit schwarz eingezeichneten A- und B-Box-Motiven

Abbildung modifiziert nach Sultana *et al.* 2017 und Cheung *et al.* 2018

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Der Anteil von Genen im haploiden Gesamtgenom der sozialen Amöbe *Dictyostelium discoideum* liegt bei etwa 65 % und die Länge der intergenischen Bereiche beträgt durchschnittlich weniger als 1 kb. Trotz dieser Kompaktheit des Genoms nehmen transposable Elemente ca. 10 % der gesamten genomischen DNA von *D. discoideum* ein. Um Insertionsmutagenesen während der Mobilisierung transposabler Elemente im Genom von *D. discoideum* zu vermeiden, bedarf es daher molekularer Mechanismen, die eine sichere Integration der mobilen Elemente gewährleistet. So besitzen die LTR-Retrotransposons aus *D. discoideum* Skipper-1, Skipper-2 und DGLT-A besondere Integrationspräferenzen. Skipper-1 integriert in heterochromatische Bereiche, während Skipper-2 zielgerichtet hinter- und DGLT-A vor tRNA-Genen integriert.

Ziel dieser Arbeit ist es, den molekularen Mechanismus, der dem LTR-Retrotransposon DGLT-A zur Identifikation von Integrationsorten dient, näher zu charakterisieren. DGLT-A besitzt eine Integrationspräferenz von ca. 15 bp vor tRNA-Genen. Da das LTR-Retrotransposon Ty3 aus *S. cerevisiae* ebenfalls zielgerichtet ca. 15 bp vor tRNA-Genen integriert und DGLT-A strukturell ähnlich ist, soll untersucht werden, ob beide Elemente dieselben Komponenten des Präinitiationskomplexes der RNA-Polymerase III für positionsspezifische Integration heranziehen. Der Integrationsmechanismus des Hefe-Elements Ty3 beruht auf einer Interaktion zwischen seiner Integrase und den Untereinheiten TBP/Brf1 des TFIIB-Komplexes der RNA-Polymerase III. Mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems und *Pulldown*-Versuchen soll untersucht werden, ob dieser molekulare Integrationsmechanismus auch von DGLT-A genutzt wird, um spezifisch vor tRNA-Genen zu integrieren. Weiterhin soll ein Retrotranspositionstest etabliert werden, mit dem die Integrationsspezifität von DGLT-A *in vivo* nachvollzogen und *in vitro*-identifizierte, möglicherweise für eine positionsspezifische Integration genutzte Protein-Interaktionen charakterisiert werden können.

Integrationspräferenzen werden auch bei den LTR-Retrotransposons Skipper-1 und Skipper-2 beobachtet. Beide Elemente besitzen Chromodomänen, die sich jedoch voneinander unterscheiden und in DGLT-A fehlen. Chromodomänen sind spezialisierte Domänen, die bestimmte Histonmodifikationen erkennen und binden können. Es soll *in vivo* untersucht werden, ob der Unterschied zwischen den Chromodomänen beider Skipper-Elemente dazu beiträgt, dass Skipper-1 in Heterochromatin und Skipper-2 hinter tRNA-Gene transponiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

| Gerät | Bezeichnung, Hersteller |
|--------------------------|--|
| Analysenwaagen | A 210 P, BP 210 P und RC 210 P, Sartorius |
| Blockthermostat | Combi-Therm CH100, Peqlab |
| FPLC-Anlage | Econo System, Bio Rad Laboratories |
| Elektroporator | Gene Pulser Xcell mit ShockPod, Bio-Rad |
| Elektrophoresen | PerfectBlue Gelsystem Mini, Peqlab PerfectBlue Doppelgelsystem Twin M/L, Peqlab |
| Geldokumentation | Gel Jet Imager 2004, Intas |
| Inkubationsschränke | TS606-G/4i, WTW und Kendro B20, Heraeus |
| Inkubationsschüttler | HT Multitron 2, Infors |
| Lichtmikroskope | Binokular-Mikroskop SZX9, Olympus Mikroskop CX 41, Olympus |
| Konfokalmikroskop | Axio Observer mit Cell Observer SD, Zeiss |
| Magnetisches Rack | DynaMag TM 2, Invitrogen |
| Mikrotiterplatten-Reader | FLUOstar Optima, BMG Labortechnologie |
| pH-Wert Messgerät | pHenomenal IP43, VWR |
| Schüttelwasserbad | SW22, Julabo |
| Schüttler | KS250 basic, IKA Labortechnik |
| Sterilwerkbänke | MRF-B, Steag und HERAsafe KS15, Kendro |
| Thermocycler | Primus 96 advanced, Peqlab |
| UV/VIS-Spektrometer | BioPhotometer, Eppendorf |
| Ultraschallsonde | Bandelin Sonoplus |
| Vakuumzentrifuge | Concentrator 5301, Eppendorf |
| Wasseraufbereitung | Seradest SD 2800, Seral Reinstwassersysteme |
| Western Blot Apparatur | PerfectBlue Semi-Dry Electroblotter SEDEK M, Peqlab |
| Zellzählsystem | CASY-Zellzähler Modell DT, Schärfe System GmbH |
| Zentrifugen | Centrifuge 5415 D/5424, 5417 R, 5810 R, Eppendorf Rotina 420 R, Hettich Avanti J-E, Beckmann Coulter |

2.1.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wiesen den Reinheitsgrad „pro Analysi“ auf. Es werden speziell in dieser Arbeit verwendete Chemikalien nachfolgend aufgelistet:

| Chemikalie | Hersteller/ Lieferant |
|---|------------------------------|
| 1,4 Dithiothreitol (DTT) | Roth |
| 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- α -D-galactopyranosid (X-Gal) | Roth |
| Acrylamid-Bis 30 % (37,5:1) | Merck |
| Agar-Agar | Roth |
| Agarose (peqGold Universal-Agarose) | PeqLab |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Roth |
| Bovine Serum Albumin (BSA) Fraktion V | Roth |
| Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) | Roth |
| Coomassie® Brillantblau G 250 | Merck |
| D-Glucose-Monohydrat | Roth |
| Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) | Roth |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Roth |
| Ethidiumbromid | Roth |
| Giemsa stain solution | Sigma-Aldrich |
| Glycerin 86 % | Roth |
| Hefeextrakt | Serva |
| Hefe-Dropout: Leu ⁻ / Trp ⁻ DO Supplement | Clontech |
| Hefe-Dropout: Leu ⁻ / Trp ⁻ / Ade ⁻ / His ⁻ DO Supplement | Clontech |
| Hefeminimalmedium: Minimal SD Base | Clontech |
| HL5-Medium | ForMedium |
| Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) | Roth |
| Laemmli-Puffer (2x) | Sigma |
| Milchpulver | Roth |
| N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-glycin (Bicin) | Roth |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Roth |
| NP40 | Roth |
| Paraformaldehyd (PFA) | Roth |
| Pepton | Roth |
| Polyethylenglykol (PEG) 1000 | Roth |
| Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) | Roth |

| Chemikalie | Hersteller/ Lieferant |
|--|------------------------------|
| ProLong Diamond Antifade Mountant mit DAPI | Thermo Fisher |
| Triton X-100 | Sigma |
| Tetraethylethylendiamin (TEMED) | Roth |
| TRIS | Roth |
| Tween 20 | Roth |

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

| Material | Hersteller |
|--|-----------------------------|
| ANTI-FLAG® M2 Magnetic Beads | Sigma-Aldrich/ Merck |
| CL-Xposure® Film | Thermo Fisher Scientific |
| <i>Coverslips</i> Poly-D-Lysine beschichtet | Neuvitro |
| DNA LoBind Tubes (1,5 ml) | Eppendorf |
| Dynabeads™ M-280 Streptavidin | Thermo Fisher Scientific |
| Einweg-Filtersystem | Greiner |
| Elektroporationsküvetten (1 mm, 2 mm) | Peqlab |
| Film-Entwickler GBX | Kodak |
| Film-Fixierer GBX | Kodak |
| Filterpapier 3 MM | Whatman |
| Glasperlen (0,25-0,5 mm) | Roth |
| <i>μ-Slide 8 Well Cell observation chamber</i> | Ibidi |
| Mikrotiterplatte (24 wells) | Greiner |
| HiTrap™ Chelating HP, 1 ml Säule | GE Healthcare Life Sciences |
| Protein LoBind Tubes (1,5 ml) | Eppendorf |
| Amersham™ Protran™ 0,45 μM NC | GE Healthcare Life Sciences |
| Petrischalen | Greiner |
| Pipettenspitzen, unsteril | Greiner |
| Rotilabo® Spitzenfilter, steril 0,22 μm | Roth |
| Vivaspin® Turbo 15 (10.000 MWCO) | Sartorius |
| ZelluTrans Dialysiermembran | Roth |

2.1.4 Verwendete Kits

| Name | Hersteller |
|---|----------------------------|
| Agarose Gel Extraction Kit | Jena Bioscience |
| Biotin PCR Labeling Core Kit | Jena Bioscience |
| ECL® Advance Western Blotting Detection-Kit | GE Healthcare Life Science |
| Gateway® LR Clonase®II Enzyme Mix | Invitrogen |
| High Fidelity Polymerase Kit | Jena Bioscience |
| Herculase II Fusion DNA Polymerase Kit | Agilent |
| Omniscript Reverse Transcription Kit | Quiagen |
| pGEM-T® Vector System | Promega |
| Taq Polymerase Kit | Jena Bioscience |
| TOPO® XL PCR Cloning Kit | Invitrogen |
| RNeasy Mini Kit | Qiagen |

2.1.5 Verwendete Enzyme und Antikörper

| Enzym | Hersteller |
|--|-----------------------------|
| Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP) | New England BioLabs (NEB) |
| DNAse (RNAse frei) | Qiagen |
| Proteinase-K | Fermentas Thermo Scientific |
| Protease Inhibitor Cocktail (100x) (P8849) | Sigma-Aldrich |
| Restriktionsendonukleasen | New England BioLabs (NEB) |
| Ribonuklease A | Carl Roth |
| RiboLock RNase Inhibitor | Thermo Fisher Scientific |
| T4-DNA-Ligase | Thermo Fisher Scientific |
| Lysozym | Roth |
| Antikörper | Hersteller |
| Anti-DDDDK tag antibody-HRP (ab2493) | Abcam |
| GFP (D5.1) XP® Rabbit mAB (#2956) | Cell Signaling |
| Anti-Rabbit IgG, HRP-linked (#7074) | Cell Signaling |

2.1.6 Größenstandards

| Name | Hersteller |
|---|--------------------------|
| pUC19 BsiSI (HpaII) | Jena Bioscience |
| Lambda DNA/PstI | Jena Bioscience |
| Low-Range und Mid-Range DNA-Ladder | Jena Bioscience |
| PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder | Thermo Fisher Scientific |

2.1.7 Verwendete Peptide

Die Peptide H3a, H3K4me3 und H3K9me3 sowie das TBP-H2'-Peptid wurden in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Diana Imhof von der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn synthetisiert.

| Name | Bezeichnung | Peptidmasse | Primärstruktur |
|---------|-------------|-------------|---------------------------------------|
| H3a | TW1/09 | 3119 kDa | ARTKQTARKSTGAKVPRKHIGSKQGGK(bio) |
| H3K4me3 | TW2/09 | 3164 kDa | ARTK(me3)QTARKSTGAKVPRKHIGSKQGGK(bio) |
| H3K9me3 | TW3/09 | 3164 kDa | ARTKQTARK(me3)STGAKVPRKHIGSKQGGK(bio) |
| TBP-H2' | | | GAKVREEIYEAFENIYPVLSAFKKVNAITQK(bio) |

2.1.8 Medien

Alle Angaben beziehen sich auf 1 l Medium. Wurden Agar-Platten hergestellt, so wurde dem Medium jeweils 18 g Agar zugeführt.

| | |
|---------------|--|
| HL5-Medium | 22 g HL5-Medium; nach dem Autoklavieren 25 ml 40 % Glucose zugegeben. |
| LB-Medium | 10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl |
| YPDA-Medium | 20 g Pepton; 10 g Hefeextrakt; 20 g Glucose; pH-Wert 6,5; nach dem Autoklavieren 15 ml 0,2 % Adenin Hemisulfat (sterilfiltriert) dazugegeben |
| SD-Medium | 26,7 g SD-Base; 0,6 g Hefe-Dropout; pH-Wert 5,8 |
| Phosphat-Agar | 20 ml 50x Phosphatpuffer; pH-Wert 6,5 |
| SOC-Medium | 5 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 1 g Glucose |

2.1.9 Antibiotika

| Antibiotikum | Eingesetzte Konzentration | Hersteller |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Ampicillin | 100 µg/ml | Roth |
| Kanamycin | 30-50 µg/ml | Serva |
| Blasticidin S | 5-8 µg/ml | Invitrogen |
| Geneticin Disulfat (G418) | 5-12 µg/ml | Thermo Fisher/ Invitrogen |
| Hygromycin | 15-50 µg/ml | Roth |
| Spectinomycin | 100 µg/ml | Sigma |

2.1.10 Mikroorganismen

Escherichia coli-K12-Stamm

Genotyp

| | |
|-----------------------------|---|
| DH5α | F ⁻ Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(r _k ⁻ , m _k ⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ ⁻ |
| Top10 | F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG λ- |
| BL21 (DE3) | F ⁻ ompT gal dcm lon hsdSB(r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene1 ind1 sam7 nin5]) |
| Rosetta TM (DE3) | F ⁻ ompT hsdSB(r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3) pRARE (Cam ^R) |
| ArcticExpress(DE3) | F ⁻ ompT hsdSB(r _B ⁻ , m _B ⁻) gal dcm ⁺ Tet ^r λ (DE3) endA Hte [cpn10, cpn60, Gent ^r] |

Saccharomyces cerevisiae-Stamm

Genotyp

| | |
|-------|---|
| AH109 | <i>MATa</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>LYS2</i> : : <i>GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3</i> , <i>MEL1</i> , <i>GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2</i> , <i>URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ</i> |
|-------|---|

Dictyostelium discoideum-Stämme

| | |
|-------------------|---|
| AX2 | axenisch wachsender Laborstamm (Sussman 1967) |
| RrpC ⁻ | Mutante der RNA-abhängigen RNA Polymerase RrpC (Wiegand <i>et al.</i> 2013) |

2.1.11 Plasmide und Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und Oligonukleotide sind im Anhang aufgeführt. Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion synthetisiert. Die jeweiligen Plasmide wurden unter Verwendung der *E.coli*-Stämme DH5α und Top10 kloniert.

2.1.12 Programme und Datenbanken

| Name | Beschreibung | Referenz/URL |
|-------------|--|---|
| ClustalX | Erzeugung von Alignments | (Larkin <i>et al.</i> 2007) |
| dictyBase | Genomdatenbank für soziale Amöben | http://dictybase.org/ |
| ExPASy | Portal zur bioinformatischen Analyse | https://www.expasy.org/ |
| MultAlin | Alignment Programm | http://multalin.toulouse.inra.fr |
| NCBI | Nucleotid und Protein Datenbank | https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi |
| OligoCalc | Analyse von Primereigenschaften | http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html |
| Prosite | Proteindatenbank | https://prosite.expasy.org/ |
| ProtParam | Proteinanalyse | https://web.expasy.org/protparam/ |
| PyMOL | Visualisierung von Biomolekülen | https://pymol.org/2 |
| pDRAW32 | theoretisches Klonieren, Erzeugung von Vektorkarten, Analyse und Bearbeitung von Sequenzen | http://www.acaclone.com |
| SWISS-MODEL | Erstellung von Strukturmodellen | http://swissmodel.expasy.org |

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 PCR

Die PCR wurde unter Standardbedingungen in 20- und 50- µl-Ansätzen durchgeführt. Je nach *Template* wurden 2-10 µl genomische DNA eingesetzt und 1-3 µl cDNA. Als Polymerasen wurden, wie unter 2.1.4 aufgeführt, *HighFi*, *Taq* und *Herculase* inklusive ihrer im Kit enthaltenen Komponenten eingesetzt. Die *Annealing*-Temperatur aller Oligonucleotide (siehe Anhang) lag standardmäßig bei 56-60 °C. Die Elongationszeit variierte, wie bekannt, zwischen 30 sec und 2 min, je nach Länge des zu amplifizierenden DNA-Stücks.

Weitere molekularbiologische Standardmethoden werden in dieser Arbeit nicht näher erläutert. Bei der Verwendung von Kits wurden die entsprechenden Methoden, wenn nicht extra aufgezeigt, nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Kultivierung von *Dictyostelium discoideum*

Wie unter 2.1.10 aufgeführt, wurden zur Kultivierung von *Dictyostelium discoideum* Laborstämme etabliert, welche in der Lage sind axenisch zu wachsen (Sussman 1967, Watts und Ashworth 1970). Dazu wurde sowohl der Stamm AX2 als auch die RrpC-Mutante in Petrischalen mit HL5-Medium bei 22 °C kultiviert. Die Kultivierung der Schüttelkulturen erfolgte unter gleichen Bedingungen. Um einen Übergang in die stationäre Wachstumsphase zu vermeiden, wurden die Zellen bei 150 rpm bis zu einer Dichte von $4-6 \times 10^6$ Zellen pro ml inkubiert. Nach Transformationen wurde mit entsprechenden Antibiotika selektioniert. Hierfür wurden Geneticin Disulfat (G418) (8-12 µg/ml), Hygromycin (15-50 µg/ml) und Blastidicin S (5-8 µg/ml) eingesetzt.

2.2.2.2 Elektrotransformation von *D. discoideum*-Zellen

Tabelle 1: Zusammensetzung E50-Puffer

| Puffer | Zusammensetzung |
|--------------|---|
| E50 (500 ml) | 2,38 g HEPES; 1,86 g KCl; 0,29 g NaCl; 0,5 ml von 1 M MgSO ₄ ; 0,21 g NaHCO ₃ ; 0,08 g NaH ₂ PO ₄ ddH ₂ O; pH-Wert 7,0 |

Um Plasmid-DNA in *D. discoideum* einzuführen, wurden die Zellen durch Elektroporation

transformiert. Hierfür wurden pro Transformation $1-3 \times 10^7$ Zellen eingesetzt. Die benötigte Menge an Zellen wurde aus der Schüttelkultur genommen und bei 900 rpm für 2-3 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 50 ml kaltem E50-Puffer durch vorsichtiges Klopfen resuspendiert und gewaschen. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 900 rpm für 2-3 min bei 4 °C bevor der Überstand verworfen und die Zellen für 5 min auf Eis gestellt wurden. Danach wurden mindestens 100 µl der Zellsuspension in sterile und gekühlte Elektroporationsküvetten (Spaltbreite 1 mm) aufgeteilt und 5-30 µg Plasmid-DNA hinzugegeben. Die Elektroporation erfolgte anschließend mit folgenden Parametern: 750-850 V; 25 µF; Widerstand (Ω) ∞ . Es wurden pro Küvette 2 Pulse abgegeben mit einem Intervall von 5 sec. Direkt danach wurde in die Küvette 1 ml HL5-Medium gegeben und die Zellen wieder für 10 min auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellen über Nacht in einer Petrischale mit 10 ml HL5-Medium kultiviert, bevor nach ca. 12-15 Stunden das Medium gegen Selektionsmedium ausgetauscht wurde. Zur weiteren Kultivierung wurde das Selektionsmedium alle 2-3 Tage ersetzt. Nach 7-10 Tagen wurden resistente Klone sichtbar, die die Plasmid-DNA aufgenommen hatten. Je nach Versuchsansatz und -ziel wurden die Klone entweder als Einzelklon gepickt und auf Mikrotiterplatten weiter kultiviert, oder sie wurden für folgende Experimente „gepoolt“. Um die Experimente längerfristig zu lagern, wurden jeweils Gefrierkulturen von Sporen hergestellt.

2.2.2.3 Herstellung von Gefrierkulturen von *D. discoideum*

Tabelle 2: Zusammensetzung Phosphatpuffer

| Puffer | Zusammensetzung |
|-------------------------|---|
| Phosphatpuffer (50x) | 99,86 g KH_2PO_4 ; 17,80 g Na_2HPO_4 ; pH-Wert 5,7; |

Für eine dauerhafte Lagerung der transformierten AX2- und RrpC⁻-Stämme wurden diese zuerst in Schüttelkulturen wachsen gelassen. Bevor die Zellen die stationäre Phase erreichten, wurden 1×10^8 Zellen entnommen und diese bei 900 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 20 ml kaltem und sterilem 1xPhosphatpuffer gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 5 min bei 900 rpm und 4 °C wurde der Überstand erneut verworfen und das Pellet in 5 ml 1xPhosphatpuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde daraufhin auf eine Phosphatplatte gegeben und ca. 30 min lang stehen gelassen, um ein Absetzen der Zellen zu gewährleisten. Zum Trocknen der Platten wurden diese unter einer sterilen Werkbank geöffnet und ca. 10 min offen stehen gelassen. Danach

wurden die Phosphatplatten für 2-3 Tage in den Brutschrank bei 22 °C gestellt. Durch den Nahrungsmangel fingen die Zellen an zu aggregieren und Fruchtkörper zu bilden. Für die Herstellung der Gefrierkulturen wurden daraufhin mit Hilfe von sterilen Zahnstochern die fertigen Fruchtkörper (inklusive Sporen) von den Phosphatplatten gekratzt und in 200-500 µl 86 % Glycerin gelöst. Die Gefrierkulturen wurden bei -80 °C gelagert. Eine erneute Kultivierung konnte erfolgen, indem man mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers einen Teil des Materials aus der Gefrierkultur entnahm und diesen in HL5-Medium (ohne Selektion) abspülte. Nachdem man wieder die Ausbildung von vegetativen Zellen beobachten konnte, wurde dem Medium nach Bedarf zusätzlich Antibiotikum zugeführt.

2.2.2.4 Herstellung von Zellpellets

Um Gesamt-RNA, genomische DNA oder Proteine aus *D. discoideum* Zellen zu isolieren, wurden diese zu einem Zellpellet verarbeitet. Für einen Ansatz wurden 2×10^7 Zellen geerntet und bei 4 °C für 5 min bei 900 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 20 ml 1xPhosphatpuffer resuspendiert und gewaschen. Danach wurde die Zellsuspension ein weiteres Mal unter den oben beschriebenen Bedingungen zentrifugiert (4 °C; 5 min; 900 rpm). Das Zellpellet wurde danach in 1 ml 1xPhosphatpuffer aufgenommen und für 1 min bei 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin abgenommen und das Zellpellet bei -80 °C eingefroren, welches somit für die Isolation von genomischer DNA, Gesamt-RNA oder Proteinanalyse via Western Blot, zur Verfügung stand.

2.2.2.5 Isolation genomischer DNA

2.2.2.5.1 Schnellpräparation für PCR

Tabelle 3: Komponenten zur Isolation genomischer DNA - Schnellpräparation

| Komponenten | Menge |
|---------------------------|--------|
| ddH ₂ O | 336 µl |
| 10x Taq-Polymerase-Puffer | 40 µl |
| Triton X-100 (10 %) | 20 µl |
| Proteinase K (10 mg/ml) | 4 µl |

Für die Isolation von genomischer DNA aus *D. discoideum*, welche hauptsächlich für PCR Screenings geeignet ist, wurde, wie unter 2.2.1.4 beschrieben, ein Zellpellet mit 2×10^7 Zellen verwendet. Das Pellet wurde in oben aufgeführtem Puffer resuspendiert und bei 56 °C für 60 min inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Proteinase K bei 95 °C für 10 min. Danach wurde die Zellsuspension für 1 min bei 13.000 g abzentrifugiert und der

Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 6 µl RNase A (1 mg/ml) für 30 min bei Raumtemperatur erfolgte der Verdau der RNA. Für das Ansetzen einer PCR wurden 2-10 µl der genomische DNA verwendet. Die genomische DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.2.5.2 genomische DNA hoher Reinheit

Tabelle 4: Komponenten zur Isolation von genomischer DNA - hoher Reinheit

| Puffer | Zusammensetzung |
|----------------|--|
| Lysepuffer | 0,32 M Saccharose; 10 mM Tris-HCl; pH-Wert 7,5; 5 mM MgCl ₂ ; 1 % Triton X-100 |
| Pufferlösung A | 10 mM Tris-HCl; pH-Wert 7,5; 10 mM EDTA |
| Pufferlösung B | 10 mM Tris-HCl; pH-Wert 7,5; 0,7 % SDS |

Um reine, verdaubare, genomische DNA aus *D. discoideum* Zellen zu erhalten wurden 5×10^8 Zellen aus einer Schüttelkultur entnommen und bei 4 °C und 900 rpm für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit 50 ml eiskaltem Lysepuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 1 ml 10 % Triton-X und einer 10-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte eine Zentrifugation bei 14.000 g für 30 min bei 4 °C. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Zellkernpellet in 5 ml Pufferlösung A resuspendiert. Danach erfolgte die Zugabe von 5,5 ml Pufferlösung B, 30 µl RNaseA (1 mg/ml) und eine Inkubation im Wasserbad bei 37 °C für 30 min. Anschließend wurden 40 µl (20 mg/ml) Proteinase K zugegeben und die Lösung für 60 min bei 55 °C inkubiert. Nachdem 10 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol zugegeben und vermischt wurde, erfolgte eine Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 14.000 g. Danach wurde die obere Phase - ca. 8 ml - vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte die Zugabe von weiteren 8 ml Chloroform/Isoamylalkohol in das Reaktionsgefäß und ein Vermischen der beiden Lösungen. Nachdem nochmals 30 min bei 4 °C und 14.000 g zentrifugiert wurde, wurde wieder die obere Phase – ca. 5 ml – vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zudem wurden 12,5 ml 100 % Ethanol hinzugegeben und 500 µl 5 M NaCl. Die Lösung wurde gut durchmischt und danach über Nacht bei -20 °C inkubiert, um die genomische DNA aus der Lösung zu fällen. Nächsten Tag erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C für 30 min bei 14.000 g. Das dabei erhaltene DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend in 400 µl DNase freiem Wasser aufgenommen. Die DNA wurde somit in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zudem mit 1 ml 100 % Ethanol und 40 µl 5 M NaCl versetzt. Es erfolgte eine weitere Fällung der DNA, diesmal in

kleinerem Volumen, für 30 min bei -20 °C. Danach wurde für 20 min bei 4 °C und 14.000 g zentrifugiert und dreimal mit 70 % Ethanol gewaschen. Das Trocknen des DNA Pellets erfolgte in einem Heizblock bei 37 °C für ca. 5 min. Die reine, genomische DNA wurde danach in 400 µl Low-TE Puffer oder DNase-freiem Wasser aufgenommen. Die Konzentration wurde, nachdem sich das Pellet gelöst hatte, durch eine photometrische Messung bei 260 nm ermittelt.

2.2.2.6 Isolation von RNA

Um Gesamt-RNA aus *D. discoideum*-Zellen zu isolieren wurden 2×10^7 Zellen eingesetzt. Zudem wurde das *RNeasy Mini-Kit* von Qiagen für diese Methode verwendet. Die Isolation der RNA erfolgte nach dem vom Hersteller gelieferten Protokoll zur „Extraktion von RNA aus Zellkulturen“. Ein zusätzlicher Schritt während dieses Prozesses ist das Verdauen von DNA. Hierfür wurde das *RNase-Free DNase-Set* - ebenfalls von Qiagen - verwendet. Das Umsetzen dieser Methode erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Nach der Isolation wurde die Konzentration der Gesamt-RNA mittels photometrischer Messung bei 260 nm ermittelt und die RNA bei -80 °C gelagert.

2.2.2.7 cDNA-Synthese

Die Synthese der *complementary*-DNA (cDNA) wurde mit dem *Omniscript® Reverse Transcription Kit* von Qiagen durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Für die Reaktion wurde, soweit nicht anders angegeben, 300-500 ng RNA und bei unspezifischer cDNA Synthese ein Primergemisch eingesetzt. Hierbei wurden Oligo-dT- und Random-Hexamer-Primer im Verhältnis 1:1 verwendet. Für die anschließende PCR wurden cDNA-Mengen zwischen 1 µl und 5 µl eingesetzt.

2.2.2.8 Retrotranspositionstest

Mit dem Retrotranspositionstest wird die Mobilisierung und Quantifizierung von artifiziellen Retrotransposons in *D. discoideum* untersucht (Sjol et al. 2011). Hierfür musste das artifizielle Retrotransposon (DGLT-A^{bsr}) stabil in das Genom der Zellen gebracht werden. Dies erfolgte durch eine Co-Transformation mit einem G418-Resistenz vermittelnden Plasmid namens *pISAR*. Wie unter 2.2.2.2 beschrieben wurden beide Plasmide mittels Elektroporation in die Zellen gebracht. Hierfür wurden unterschiedliche Mengen an Plasmid-DNA eingesetzt. Die eingesetzte Menge variierte je nach Erfahrungswerten zwischen 5 µg und 20 µg DNA. Nach der Transformation wurden die Zellen zuerst auf G418-resistente Klone selektioniert, wobei

das Medium alle 2-3 Tage vorsichtig ausgetauscht wurde. Hierfür wurde das Medium an einem bestimmten Punkt der Petrischale sowohl abgesaugt, als auch wieder zugegeben, um ein Abspülen der sich bildenden Klone zu vermeiden. Nach ca. 7-10 Tagen konnten die hochgewachsenen G418-Klone *gepoolt* werden. Hierfür wurden die Petrischalen abgespült und die Zellen in Schüttelkultur gebracht. Nachdem die Kultur eine Zelldichte von $4-6 \times 10^6$ Zellen pro ml aufwies wurde diese wieder auf Petrischalen aufgeteilt um mit der Blasticidin-Selektion, und somit dem Nachweis der Sprungereignisse, zu starten. Hierfür wurden pro Platte $1-10 \times 10^6$ Zellen ausgesät. Es wurde gewartet, bis sich die Zellen abgesetzt hatten und einen konfluenten Zellrasen aufzeigten. Danach wurde das mit Blasticidin versetzte HL5-Medium auf die Zellen gegeben. Auch hier wurde alle 2-3 Tage das Medium gewechselt. Nach ca. 8-10 Tagen erhielt man resistente Klone, die entweder einzeln gepickt wurden und als Einzelklon weiter kultiviert wurden, oder in Schüttelkultur genommen wurden und *gepoolt* wurden. Sowohl von den Einzelklonen als auch den *gepoolten* Zellen wurden für weitere Analysen, wie unter 2.2.2.4 beschrieben, Zellpellets hergestellt. Von beiden Pools – G418- und Blasticidin-resistenten Zellen – wurde je nach Bedarf zudem noch eine Gefrierkultur hergestellt.

2.2.2.9 Anfärben von *D. discoideum*-Klonen in Petrischalen

Tabelle 5: Zusammensetzung der Färbelösung

| Lösung | Zusammensetzung |
|-------------|---|
| Färbelösung | 0,5 g Kristall-Violett Pulver; 80 ml destilliertes Wasser; 20 ml Methanol; bei Raumtemperatur und dunkel lagern |

Das Medium wurde zuerst aus der Petrischale abgezogen und danach ca. 10 ml 1x Phosphatpuffer auf die Zellen gegeben. Die Petrischale wurde daraufhin vorsichtig geschwenkt und der Phosphatpuffer wieder abgezogen. Danach wurden ca. 5 ml Färbelösung vorsichtig über den Rand auf die Zellen gegeben und diese damit für 20-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit sollten die Platten unbedingt unberührt bleiben um Erschütterungen zu vermeiden. Die Färbelösung wurde danach vorsichtig abgezogen (kann wiederverwendet werden). Danach wurden die Platten dreimal mit Leitungswasser gewaschen. Dabei war es hilfreich die Platten in ein mit Wasser gefülltes Gefäß zu tauchen und diese etwas darin zu schwenken. Die Platten wurden daraufhin offen und herumgedreht auf einem Küchentuch getrocknet und zeigten die fixierten, dunkelvioletten Zellen. Die Durchführung erfolgte komplett unter dem Abzug.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Proteinexpression in *E. coli*-Zellen

Tabelle 6: Zusammensetzung der Coomassie-Lösung

| Lösung | Zusammensetzung |
|------------------|---|
| Coomassie-Lösung | 70 mg Coomassie Brilliantblau G250; 3 ml HCl konz., mit Wasser auf 1 l füllen |

Es wurde eine heterologe Expression durchgeführt, mit Proteinen, welche aus *D. discoideum* stammten. Die Gene dazu wurden bei der Firma Eurofins synthetisiert und codonoptimiert. Die Expression erfolgte mittels des pET33b(+) Vektors, weshalb die synthetisierten Gene vorerst in dieses System kloniert wurden (siehe Anhang).

Die fertigen Plasmide wurden in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3) mittels Elektroporation transformiert und die Zellen über Nacht bei 37 °C auf LB-Platten mit entsprechender Selektion inkubiert. Danach erfolgte eine Untersuchung der Expression vorerst in kleinem Volumen. Hierfür wurden willkürlich zwei Klone auf der Platte ausgesucht und in einer Vorkultur mit 200 rpm bei 37 °C über Nacht schütteln gelassen. Nächsten Tag wurde eine Hauptkultur (jeweils 20 ml) damit so angeimpft, dass die optische Dichte (OD_{600}) bei 0,12 lag. Die Zellen wurden ca. 60 min bei 37 °C geschüttelt und danach für weitere 30 min bei Raumtemperatur wachsen gelassen, bis sie die OD_{600} von 0,6 erreichten. Nach der Entnahme einer Probe, deren OD_{600} auf 0,35 eingestellt wurde, wurde induziert. Hierfür wurde eine Endkonzentration von 1 mM IPTG zu den Zellen gegeben und diese daraufhin ca. 5 Stunden bei Raumtemperatur und 200 rpm schütteln gelassen. Danach erfolgte eine weitere Probenentnahme aus der Hauptkultur ($OD_{600}=0,35$). Zudem wurde vor der Induktion von beiden Kulturen eine Gefrierkultur hergestellt. Hierfür wurden 500 µl 86 % Glycerin mit 1 ml der dicht gewachsenen Vorkultur vermischt und bei -80 °C eingefroren.

Zur Analyse der Expression wurden die abgezogenen Proben (beide OD_{600} 0,35) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 40 µl PBS resuspendiert. Zudem wurden 40 µl 2xLaemmli Puffer hinzugegeben und die Proben bei 95 °C für 10 min aufgekocht. Der optische Nachweis der Expression erfolgte via *SDS-PAGE* mit anschließender Coomassie-Färbung. Bei gelungener Expression der Proteine erfolgte die oben beschriebene Durchführung nochmals, allerdings in größerem Volumen (bis zu 200 ml). Das Zellpellet wurde nach der Induktion und Expression bei 4 °C für 5 min bei 5.000 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet bei -80 °C eingefroren.

2.2.3.2 Proteinaufreinigung aus *E. coli*-Zellen

Tabelle 7: Zusammensetzung der Puffer zur Proteinaufreinigung

| Puffer (1l) | Zusammensetzung |
|------------------------------------|--|
| Lysispuffer | 50 mM NaH ₂ PO ₄ ; 300 mM NaCl; <u>10 mM</u> Imidazol; pH 8,0 |
| + Lysozym (frisch) | 1 mg/ml |
| + Proteaseinhibitor(100x) (frisch) | 1x |
| Waschpuffer | 50 mM NaH ₂ PO ₄ ; 300 mM NaCl; <u>10 mM</u> Imidazol; pH 8,0 |
| Elutionspuffer | 50 mM NaH ₂ PO ₄ ; 300 mM NaCl; <u>500 mM</u> Imidazol; pH 8,0 |

Das Zellpellet wurde für 20 min auf Eis aufgetaut und danach in 5 ml Lysispuffer (inklusive der frisch zugegebenen Komponenten) resuspendiert. Danach wurden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschallbehandlung. Hierbei wurden 3x für 30 sec in einem Frequenzbereich von 10-40 kHz (15 % *Output*) Ultraschallwellen abgegeben. Die Zellen wurden zwischen den Beschallungsimpulsen jedoch immer für mindestens 30 sec auf Eis platziert um eine Überhitzung zu vermeiden. Nach der Sonifizierung wurden die Zelltrümmer für mindestens 30 min bei 4 °C und 11.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches, vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt.

Die Proteinaufreinigung erfolgte über einen His₆-Tag. Die His₆-Tag Proteine wurden hierbei über eine Ni²⁺/NTA-Säule geleitet. Der Polyhistidin-Tag – und somit das daran hängende Protein – bindet wegen seiner Affinität zu zweiwertigen Nickel-Ionen an die Säule und bildet somit einen Chelatkomplex. Durch die Bindung an den am Feststoff gekoppelten Chelator können durch Fahren eines Konzentrationsgradienten für Imidazol ungebundene Proteine entfernt werden. Die Elution der gebundenen Proteine hingegen erfolgt durch Spülen in Bereichen von 250-500 mM Imidazol. Die dabei erhaltenen Fraktionen wurden via *SDS-PAGE* analysiert. Dafür wurden aus jeder Fraktion 30 µl Probe entnommen und mit 30 µl 2xLaemmli-Puffer versetzt. Die Lösungen wurden daraufhin bei 95 °C für 5 min gekocht und danach gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie eingefärbt. Fraktionen, die das jeweilige rekombinante Protein enthielten, wurden daraufhin vereint und bei 4 °C gegen 20 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) über Nacht dialysiert. Nach der Dialyse wurde die Proteinlösung aufkonzentriert. Hierzu wurde die Probe mittels einer Vivaspin® Säule bei 4 °C und 3200 rpm so lange zentrifugiert bis die Probe entsprechend der weiteren Verarbeitung eingengt war. Zuletzt wurde der Proteingehalt mittels Bradford ermittelt. Zur Lagerung wurde die Lösung in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

2.2.3.3 Protein-Protein-Pulldown

Tabelle 8: Zusammensetzung der Puffer zum Protein-Protein-Pulldown

| Puffer | Zusammensetzung |
|----------|--|
| Puffer 1 | 20 mM Tris-HCl; pH 7,5 |
| Puffer 2 | 20 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; pH 7,5 |
| Puffer 3 | 20 mM Tris-HCl; 200 mM NaCl; 0,05 % Tween 80; pH 7,5 |

Mit Hilfe von *Pulldown*-Experimenten konnten Protein-Protein-Interaktionen *in vitro* nachgewiesen werden. Hierfür wurden pro Ansatz 20 µl ANTI-FLAG® M2 Magnetic Beads verwendet. Diese wurden in Protein-LoBind-Tubes überführt und zweimal mit 200 µl Puffer 1 gewaschen (alle Angaben beziehen sich auf einen Ansatz). Hierzu wurde das LoBind-Tube mit den magnetischen Beads in ein magnetisches Rack gestellt. Nach ca. 1 min sammelten sich die magnetischen Beads am Rand des Reaktionsgefäßes und die darüber stehende Flüssigkeit konnte mit einer Pipette abgezogen werden. Nach dem ersten Waschen wurden die Beads bei 4 °C über Nacht geblockt. Hier wurde, je nach untersuchter Proteininteraktion, 4 % BSA oder 1 % Gelatine zu Puffer 1 gegeben und 200 µl dieser Lösung auf den Beads verteilt. Nächsten Tag wurde die Blockierlösung wieder abgezogen und die Beads zweimal mit Puffer 1 gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe des Proteins mit FLAG-Tag. Von der zu inkubierenden Lösung wurden zuvor 10 % abgenommen um diese später als *Input* auf das Gel zu laden. Die restlichen 90 % der Lösung wurden mit den Beads inkubiert. Hierbei war es besonders wichtig, dass ein hoher Proteingehalt (20-40 µg) in einem geringen Volumen von 50 µl auf die Beads gegeben wird. Das Binden der FLAG-Tags an die Anti-FLAG-Antikörper der Beads erfolgte in einem Drehrad, rotierend bei 4 °C für 1,5-2 Stunden. Danach wurden ungebundene FLAG-Tag-Proteine via Magnet entfernt und 50 µl der GFP-Tag-Proteine (20-40 µg) in das Reaktionsgefäß zu den Beads gegeben (wieder 10 % *Input* vorher abgenommen). Die Inkubation mit den GFP-Tag-Proteinen erfolgte ebenfalls rotierend für 1,5-2 Stunden bei 4 °C. Danach erfolgten die Waschschritte. Hierbei wurden zuerst die ungebundenen GFP-Tag-Proteine magnetisch abgezogen und zweimal mit Puffer 2 in 200 µl gewaschen. Während des zweiten Waschgangs wurden die Beads in ein frisches Protein LoBind-Tube überführt. Hier erfolgte nochmals ein Waschgang mit Puffer 2, wieder mit 200 µl. Ein weiterer Waschschritt erfolgte mit 200 µl Puffer 3 bevor die Beads ein weiteres Mal in ein frisches Protein-LoBind-Tube überführt wurden. Danach wurden die immobilisierten Proteine an den Beads mit 20 µl Puffer 3 eluiert und mit 20 µl 2xLaemmli-Puffer bei 95 °C für 10 min aufgekocht. Die Analyse des *Pulldowns* erfolgte mittels *Western Blot*.

2.2.3.4 Peptid-Protein-Pulldown

Tabelle 9: Zusammensetzung der Puffer zum Peptid-Protein-Pulldown

| Puffer | Zusammensetzung |
|--------------------------|--|
| Waschpuffer1 | 100 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0 |
| Waschpuffer 2 | 100 mM NaH ₂ PO ₄ , 200 mM NaCl, pH 8,0; |
| Waschpuffer 3 | 100 mM NaH ₂ PO ₄ , 800 mM NaCl, pH 8,0 |
| frisch zum Puffer geben: | 5 % Tween20 Stammlösung |
| | 2 % BSA Stammlösung |
| | 1 mM DTT, Proteaseinhibitor (ohne EDTA) |

Die Bindung zwischen biotinyliertem (bio) Peptid und einem heterolog exprimierten Protein wurde mittels dieses Protokolls nachgewiesen. Die synthetisierten Peptide sind unter 2.1.7 genauer aufgezeigt. Alle Mengenangaben beziehen sich auf einen Ansatz. Es wurden 20 µl Dynabeads M280 in Protein-LoBind-Tubes gegeben, diese für 30 sec in ein magnetisches Rack gestellt und der Überstand abgenommen. Anschließend wurden die Beads mit 200 µl Waschpuffer 2 (WP2) + 0,01 % Tween20 dreimal gewaschen. Dafür wurden 200 µl WP2 auf die Beads gegeben, diese vorsichtig resuspendiert und wieder zurück in das magnetische Rack gestellt. Der Überstand wurde abgenommen und der Vorgang wurde wiederholt. Nach dem Waschen wurden die Beads in 400 µl WP2 + 0,01 % Tween20 + 2 % BSA blockiert. Dafür wurden diese für 30 min bei Raumtemperatur in einem Drehrad rotiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und die Kopplung des bio-Peptids erfolgte. Dafür wurden die Beads mit 150 µl WP2 + 0,01 % Tween20 + 0,1 % BSA + Protease-Inhibitor + 1 mM DTT versetzt und resuspendiert. Das zu koppelnde Peptid wurde mit 1-3 µg in 50 µl desselben Puffers gelöst und danach mit den 150 µl und den Beads vereinigt (Endvolumen: 200 µl). Die Bindung erfolgte bei 3-4 Stunden im Drehrad bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgten drei Waschschriffe mit WP1 + 0,01 % Tween20, um nicht gebundenes bio-Peptid zu entfernen. Während des dritten Waschschriffes wurde das Reaktionsgefäß gewechselt. Anschließend erfolgte die Bindung des heterolog exprimierten Proteins an die mit Peptid beschichteten Beads. Dafür wurden 100 µl WP1 + 0,01 % Tween20 + 0,1 % BSA + Protease-Inhibitor + 1 mM DTT zu den Beads gegeben. In diesem WP1 waren zusätzlich 10 – 20 µg Protein. Die Inkubation dauerte 2,5 Stunden bei 4 °C unter ständigem Rotieren im Drehrad. Bevor die Proteinlösung zu den Beads gegeben wurde, wurden noch 10 % Input abgenommen und ebenfalls, jedoch in einem gesonderten Reaktionsgefäß, mitrotiert. Anschließend wurde der Input mit 2xLP versetzt und bei 95 °C aufgekocht. Nach der Inkubation der Beads mit dem Protein wurden

diese 4-6x mit jeweils 500 µl WP3 + 0,01 % Tween20 gewaschen. Dabei wurde beim zweiten Waschschrift und beim sechsten Waschschrift darauf geachtet, dass die Beads in neue Reaktionsgefäße überführt werden. Die Beads wurden danach in 20 µl WP3 und 20 µl 2xLP eluiert und für 10 min bei 95 °C aufgeköcht. Die Detektion erfolgte mittels Western Blot.

2.2.3.5 SDS-PAGE

sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

Tabelle 10: Zusammensetzung der Puffer für die SDS-PAGE

| Puffer | Zusammensetzung |
|----------------------|---|
| SDS-Laufpuffer (10x) | 250 mM Tris-HCl; 2 M Glycin; 1 % SDS; pH 8,3 |
| Trenngel 12,5 % | ddH ₂ O 9,2 ml Trenngel-Puffer (4x) 7 ml Acrylamid-Bis 30 % 11,7 ml APS 90 µl TEMED 30 µl |
| Sammelgel | ddH ₂ O 7,7 ml Sammelgel-Puffer (10x) 1 ml Acrylamid-Bis 30 % 1,3 ml APS 30 µl TEMED 15 µl |

Die Gelelektrophorese wurde mit Polyacrylamid-Gelen (12,5 %) und SDS durchgeführt (Laemmli 1970). Alle Proben wurden 1:1 mit 2xLaemmli-Puffer versetzt bevor sie bei 95 °C für mindestens 5 min aufgeköcht wurden. Die Elektrophorese erfolgte bei 110-160 Volt mit 1xSDS-Laufpuffer. Die Proteine wurden daraufhin entweder Coomassie gefärbt oder via *Western Blot* auf eine Membran transferiert.

2.2.3.6 Western Blot

Tabelle 11: Zusammensetzung der Puffer für den Western Blot

| Puffer | Zusammensetzung |
|-----------------|---|
| TBS (10x) | 200 mM Tris; 1,5 M NaCl; pH 7,4 |
| TBS-T | 1xTBS; 0,05 % Tween 20 |
| Anodenpuffer I | 300 mM Tris; 20 % Methanol; pH 10,4 |
| Anodenpuffer II | 25 mM Tris; 20 % Methanol; pH 10,4 |
| Kathodenpuffer | 25 mM Tris; 40 mM 6-Amino-Hexansäure; 20 % Methanol; pH 9,4 |

| | |
|----------------------|--------------------------|
| BSA-Blockierlösung | 3 % BSA in TBS-T |
| Milch-Blockierlösung | 5 % Milchpulver in TBS-T |

Western-Blot-Analysen wurden mit der Semidry-Methode durchgeführt. Hierbei wurden die Proteine für 1-1,5 Stunden mit 0,8-1,2 mA/cm² auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran ca. 60 min mit 3 % BSA in TBS-T-Puffer geblockt. Nach der Zugabe des primären Antikörpers wurde dieser über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert.

Tabelle 12: Verdünnung der Antikörper

| Antikörper | Verdünnung |
|-----------------------------|------------|
| Anti-DDDDK tag antibody-HRP | 1:5000 |
| GFP (D5.1) XP® Rabbit mAB | 1:2000 |
| Anti-Rabbit IgG, HRP-linked | 1:2000 |

Die Membran wurde am nächsten Tag, nach dem Abziehen des primären Antikörpers, dreimal mit TBS-T gewaschen. Jeder Waschgang dauerte ca. 15 min, bevor ein weiterer Blockierschritt mit 5 % Milchpulver in TBS-T für ca. 30 min erfolgte. Die Inkubation des sekundären Antikörpers, welcher mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt ist, wurde für ca. 60 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend erfolgte auch hier ein Waschschrift mit TBS-T dreimal für ca. 30 min. Die Detektion erfolgte mittels des ECL®-Western Blot Systems über Chemilumineszenz und Röntgen-Film. Die Detektionszeiten betrug je nach aufgetragener Proteinmenge und eingesetztem Antikörper 1-30 min.

2.2.3.7 Hefe-Zwei-Hybrid-System

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System (*yeast two-hybrid system*, Y2H) ist eine biochemische Methode um Proteininteraktionen zu identifizieren. In dieser Arbeit wurde das *Matchmarker Gold Y2H-System* verwendet. Dieses beruht auf einem GAL4-basierten System. Hierbei wurde der Transkriptionsfaktor GAL4 gentechnisch in zwei Domänen geteilt. Die DNA-bindende Domäne (DNA-BD) wird über den Vektor pGBKT7 exprimiert, während die transaktivierende Domäne (AD) im Vektor pACT2 liegt. Um mögliche Interaktionspartner gegeneinander zu testen, werden diese via Klonierung so in die Plasmide eingebracht, dass sie bei der Expression als Fusionsprotein an den jeweiligen Domänen AD oder BD sitzen. Nur bei einer Interaktion der Proteine wird der GAL-4-Transkriptionsfaktor wieder rekonstruiert und die Transkription vierer unabhängiger Reportergene (AUR1-C, ADE2, HIS3, MEL1) kann erfolgen (Chien *et al.*

1991, Fields und Song 1989).

2.2.3.7.1 Herstellung kompetenter Hefezellen des Stammes AH109

Tabelle 13: Zusammensetzung der Lösungen zur Herstellung kompetenter Hefezellen (AH109)

| Lösung/Puffer | Zusammensetzung |
|---------------------|---|
| Lösung A | 0,5 M Ethylenglycol; 10 mM Bicin; 1 M Sorbitol |
| 1 M Bicine (100 ml) | 16,35 g Bicin; ddH ₂ O; pH 8,35 (mit NaOH eingestellt) |

Zunächst wurden Zellen des AH109-Stammes von *Saccharomyces cerevisiae* auf YPDA-Platten ausgestrichen und diese bei 30 °C für 3-4 Tage im Brutschrank wachsen gelassen. Danach wurde eine Vorkultur hergestellt. Dafür wurden 1-2 Kolonien mit einer sterilen Impföse abgelöst und ca. 20 ml YPDA-Medium damit angeimpft. Das Wachstum der Zellen erfolgte bei 30 °C über Nacht und 150 rpm. Danach wurden 1-2 ml der Vorkultur in eine 100 ml Hauptkultur überführt und die Zellen ca. 4-5 Stunden wachsen gelassen (30 °C bei 150 rpm), bis diese eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,4-0,6 aufwiesen. Die Hauptkultur wurde danach in 50 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und bei 4 °C für 5 min bei ca. 2000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Anschließende Schritte fanden alle auf Eis statt, um die Zellen kalt zu halten. Das Zellpellet wurde daraufhin mit Lösung A resuspendiert und die Zellen gewaschen. Danach erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 5-10 min bei 4 °C und 2500 rpm. Der Überstand wurde danach ebenfalls verworfen und das Zellpellet mit 1 ml Lösung A resuspendiert. Zusätzlich wurde in die Zellsuspension 55 µl DMSO gegeben. Daraufhin wurden 200 µl der Zellsuspension in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Um die Transformationsrate zu erhöhen war es wichtig die Zellen mindestens 48 Stunden bei -80 °C zu lagern, bevor diese transformiert wurden.

2.2.3.7.2 Transformation von Hefezellen des Stammes AH109

Tabelle 14: Zusammensetzung der Lösungen zur Transformation von Hefezellen (AH109)

| Lösung/Puffer | Zusammensetzung |
|-------------------------------------|--|
| LösungB (150 ml ddH ₂ O) | 400 mM PEG1000; 200 mM Bicine; |
| LösungC (500 ml ddH ₂ O) | 150 mM NaCl; 10 mM Bicine |
| NaCl-Lösung | 0,9 % NaCl-Lösung |
| Selektionsplatten | SD-Medium, Leu ⁻ / Trp ⁻ DO Supplement |
| Interaktionsplatten | SD-Medium, Leu ⁻ / Trp ⁻ / Ade ⁻ / His ⁻ DO Supplement |

Für die Hefetransformation wurden 5-10 µg Plasmid-DNA zu den gefrorenen Zellen gegeben und diese dann für 5 min im Thermoschüttler bei 37 °C kräftig geschüttelt. Danach wurde 1 ml

Lösung B hinzugefügt und die Zellsuspension für 60 min bei 30 °C leicht geschüttelt. Nach einer Stunde wurden die Zellen für 5 min bei 2000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in Lösung C resuspendiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 5 min bei 2000 rpm. Danach wurde der Überstand wieder verworfen und die Zellen in 80 µl einer 0,9 % NaCl-Lösung resuspendiert. Das gesamte Volumen inklusive der Zellen wurde mittels Pipette aufgesogen und auf Selektionsplatten mit einem sterilen Spatel ausgestrichen. Danach wurden die Platten bei 30 °C für 3-5 Tage inkubiert. Um eine mögliche Protein-Protein-Interaktion zu untersuchen wurden 20 willkürlich ausgesuchte Klone einer Selektionsplatte nach 3-5 Tagen auf eine Interaktionsplatte überimpft. Die Platten wurden daraufhin für 8 Tage bei 30 °C inkubiert. Von einer Interaktion der Proteine konnte ausgegangen werden, wenn mindestens 80 % der Transformanten auf einer Interaktionsplatte (Leu⁻/ Trp⁻/ Ade⁻/ His⁻) Wachstum zeigten (Klebe *et al.* 1983).

2.2.3.7.3 Isolation von Plasmid-DNA aus transformierten Hefezellen

Tabelle 15: Zusammensetzung des Puffers zur Isolation von Plasmid-DNA aus Hefezellen

| Lösung/Puffer | Zusammensetzung |
|---------------|------------------------|
| Lysispuffer | 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 |
| | 1 mM EDTA |
| | 300 mM NaCl |
| | 1 % SDS |
| | 2 % TritonX-100 |

Um nach dem Interaktionstest zu untersuchen, ob die Plasmide pACT2 und pGBKT7 beide korrekt in die Hefezellen transformiert wurden, wurde aus diesen die Plasmid-DNA wieder isoliert. Für dieses sogenannte *Plasmid-Rescue* wurden die Transformanten von den Selektionsplatten in eine Schüttelkultur, mit 5 ml SD-Medium (Leu⁻/ Trp⁻ DO Supplement) überführt und für 3 Tage bei 30 °C unter Selektion und bei 150 rpm schütteln gelassen. Danach wurde die Zellsuspension in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 10.000 g für 1 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 400 µl Lysispuffer resuspendiert. Danach wurden ca. 300 µl Glasperlen und 400 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol hinzugegeben und das Reaktionsgefäß mehrfach invertiert. Es erfolgte ein zweiminütiges starkes Schütteln der Lösungen, bevor diese bei 14.000 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert wurden. Danach wurde die obere, wässrige Phase vorsichtig abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Lösung wurde nochmals mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol überschichtet und für 15 Sekunden stark

geschüttelt. Danach erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 15 min bei 4 °C und 14.000 g. Auch danach wurde die wässrige obere Phase wieder vorsichtig abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Plasmid-DNA wurde daraufhin mit 100 % Ethanol (2,5 Volumen) und 3 M Natriumacetat (0,1 Volumen) gefällt. Dafür wurde die Lösung für 30 min bei -20 °C gelagert und danach für 30 min bei 14.000 g und 4°C zentrifugiert. Die pelletierte Plasmid-DNA wurde daraufhin dreimal mit 70 % Ethanol gewaschen und bei 37 °C im Heizblock für ca. 5 min getrocknet, bevor sie in 10-20 µl ddH₂O aufgenommen wurde. Für eine Elektrotransformation in *E. coli* Top10-Zellen wurden danach ca. 3-5 µl der eluierten Plasmid-DNA eingesetzt. Danach wurde ein Viertel der Zellsuspension auf LB-Ampicilin- und der Rest auf LB-Kanamycin-Platten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Nächsten Tag wurden die hochgewachsenen Klone der Methode der Plasmidpräparation unterzogen. Die isolierten Plasmide wurden daraufhin via Restriktionsverdau und Sequenzierung auf ihre Identität überprüft.

2.2.3.7.4 Herstellung von Gefrierkulturen von Hefezellen (AH109)

Die Transformanten auf den Selektionsplatten (und Interaktionsplatten) wurden in eine Schüttelkultur mit entsprechendem Selektionsmedium überführt und für 3 Tage bei 30 °C und 150 rpm geschüttelt. Danach wurde 1 ml der dichten *S. cerevisiae*-Zellsuspension in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl 86 % Glycerin versetzt. Das Reaktionsgefäß wurde mehrfach invertiert, so dass sich die Lösungen gut vermischten und danach bei -80 °C gelagert.

2.2.4 Fluoreszenzmikroskopie

Um *D. discoideum*-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie analysieren zu können, wurden die entsprechenden Expressionsvektoren mittels Elektroporation in den AX2-Stamm gebracht. Danach wurden die Zellen für ca. 5-8 Tage kultiviert und unter Selektion gehalten. Dafür wurde, je nach transformierten Plasmiden 8-10 µg G418, 50 µg Hygromycin und 5 µg Blasticidin eingesetzt. Es wurden sowohl Klone vereinzelt, aber auch *Zellpools* kultiviert und auf eine Zellzahl von 1×10^7 gebracht. Danach wurden die Zellen direkt für die Mikroskopie vorbereitet oder vorher fixiert.

2.2.4.1 Mikroskopie lebender Zellen

Für die Mikroskopie von lebenden Zellen, wurden ca. 1×10^5 Zellen in die *Cell Observation Chamber* gegeben und 30 min gewartet bis die Zellen am Boden adhärirten. Da das

HL5-Medium, in dem die Zellen kultiviert wurden, einen sehr hohen Anteil an Eigenfluoreszenz aufweist, wurde das Medium danach durch 0,2 % HL5-Medium ausgetauscht. Anschließend wurde mikroskopiert.

2.2.4.2 Mikroskopie fixierter Zellen

Um die Zellen zu fixieren wurden nach der Transformation der Expressionsplasmide in den AX2-Stamm und der darauffolgenden Selektion, die Klone auf einer 6-*well*-Platte ausgesät ($5 \cdot 10^5$ Zellen). Diese enthielten mit Poly-D-Lysin beschichtete Deckgläschen (*Coverslips*), auf denen die Zellen nach ca. 30 min adhärten. Anschließend wurde das überschüssige Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) für genau 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde 3-4x gründlich mit PBS gewaschen. Dafür war es wichtig, dass die Flüssigkeit vorsichtig am Rand abgesaugt und wieder zugegeben wurde, damit das Einsaugen von fixierten Zellen verhindert werden konnte. Nach dem letzten Waschschrift wurden die *Coverslips* in ProLong® Diamond-Eindeckmittel eingebettet und auf einem Objektträger fixiert. Das Mikroskopieren der fixierten Zellen erfolgte spätestens zwei Tage nach der Fixierung.

3 Ergebnisse

3.1 Proteininteraktionen bei der Erkennung von Integrationszielen durch DGLT-A

Dictyostelium discoideum besitzt ein haploides Genom mit einer hohen Gendichte, jedoch sehr kurzen intergenischen Bereichen. Die mobilen Elemente dieses Organismus sind somit ständig einem hohen Selektionsdruck ausgesetzt, da sie Insertionsmutagenesen in proteinkodierenden Genen ihres Wirtes vermeiden müssen, um diesen nicht dauerhaft zu schädigen. Ein ähnlicher Selektionsdruck wirkt auch auf die mobilen Elemente der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, da deren haploides Genom eine vergleichsweise hohe Gendichte wie bei *D. discoideum* aufweist (Eichinger *et al.* 2005, Glöckner *et al.* 2002, Goffeau *et al.* 1996). Als Konsequenz daraus entwickelten Retrotransposons beider Organismen Mechanismen, die eine positionsspezifische Integration in nicht-codierende Bereiche ermöglichen.

So findet man im Genom von *D. discoideum* und *S. cerevisiae*, dass speziell heterochromatische Bereiche zur sicheren Integration genutzt werden, aber auch Bereiche um tRNA-Gene herum (Glöckner *et al.* 2001, Kim *et al.* 1998). Die tRNA-Gene werden durch die RNA-Polymerase III (POLIII) transkribiert, deren Präinitiationskomplex aus den Transkriptionsfaktor-Komplexen TFIIIB und TFIIIC besteht. TFIIIB besteht aus drei Untereinheiten TBP, Brf1 und Bdp1, während TFIIIC aus *S. cerevisiae* hingegen sechs Untereinheiten zählt, die in die Subkomplexe τA und τB unterteilt werden können (siehe Abbildung 20A) (Ducrot *et al.* 2006, Male *et al.* 2015).

Man konnte beobachten, dass das LTR-Retrotransposon Ty3 aus *S. cerevisiae* ca. 15 bp vor tRNA-Gene integriert (Chalker und Sandmeyer 1992, Devine und Boeke 1996) und für diese spezifische Integration eine Interaktion zwischen der eigenen Integrase, dem Heterodimer TBP/Brf1 aus TFIIIB und der Untereinheit Tfc1 aus TFIIIC eingeht (Qi und Sandmeyer 2012, Rozenfeld und Thuriaux 2001, Yieh *et al.* 2000). In *D. discoideum* wurde durch die Analyse von Genomsequenzen gesehen, dass das LTR-Retrotransposon *Dictyostelium Gypsy-like Transposon Subtype A* (DGLT-A) an der gleichen Position integriert wie Ty3 aus *S. cerevisiae*, nämlich auch ca. 15 bp vor tRNA-Gene.

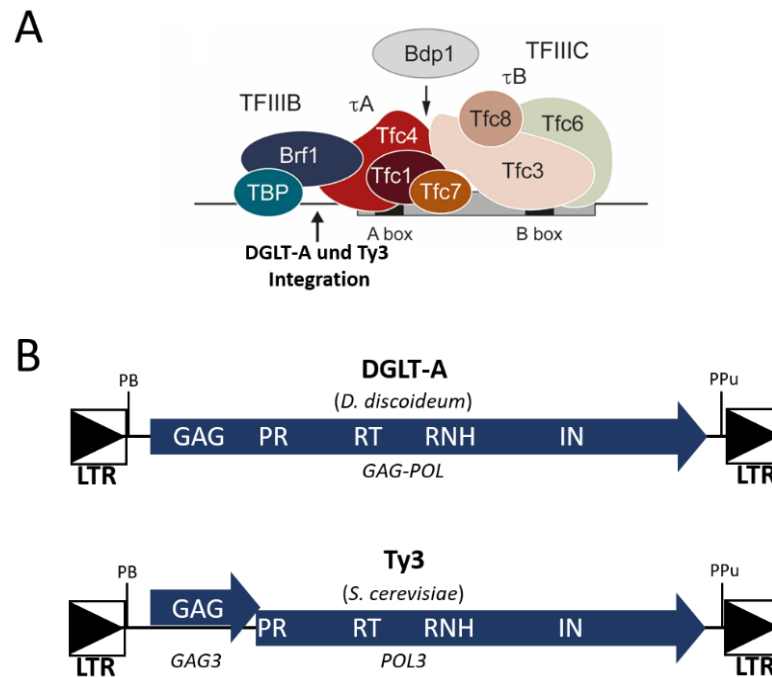


Abbildung 20: Topologie des Präinitiationskomplexes der RNA-Polymerase III und schematische Darstellung der LTR-Retrotransposons DGLT-A und Ty3

A: Darstellung des Präinitiationskomplexes der RNA-Polymerase III mit den Transkriptionsfaktor-Komplexen TFIIB und TFIIC. TFIIB besteht aus den Untereinheiten TBP, Brf1 und Bdp1. TFIIC besteht aus sechs Untereinheiten, die in die zwei Subkomplexe τA und τB aufgeteilt werden können. **B:** Schematische Darstellung der beiden LTR-Retrotransposons DGLT-A aus *D. discoideum* und Ty3 aus *S. cerevisiae*. GAG: *group specific antigen*; PR: Protease; RT: Reverse Transkriptase; RNH: Ribonuklease H; IN: Integrase; LTR: *long terminal repeats*; PB: Primerbindestelle; PPu: Polypurin-Bindestelle.

Ein Vergleich beider LTR-Retrotransposons zeigt zudem, dass die Elemente sich im Aufbau sehr ähneln (siehe Abbildung 20B). Ausnahme ist jedoch, dass die codierende Sequenz der GAG-Domäne bei DGLT-A an die des Polyproteins fusioniert ist und somit im gleichen Leseraster mit der Protease (PR), Reversen Transkriptase (RT), Ribonuklease-H (RNH) und Integrase (IN) liegt. Dieser offene Leserahmen ist bei DGLT-A 1437 Aminosäuren lang. Im Gegensatz dazu sind die GAG3- und POL3-Gene von Ty3 in zwei sich überlappende Leserahmen eingeteilt, die in das Gag3 und das Gag3-Pol3-Fusionsprotein durch eine Leserasterverschiebung translatiert werden. Vergleicht man zudem die Aminosäuresequenzen der Kerndomänen beider Retrotransposons, so zeigen die RT-RNH-Domänen, trotz der evolutionären Distanz beider Retrotransposons, eine Identität von 35,5 % (siehe Abbildung 21).

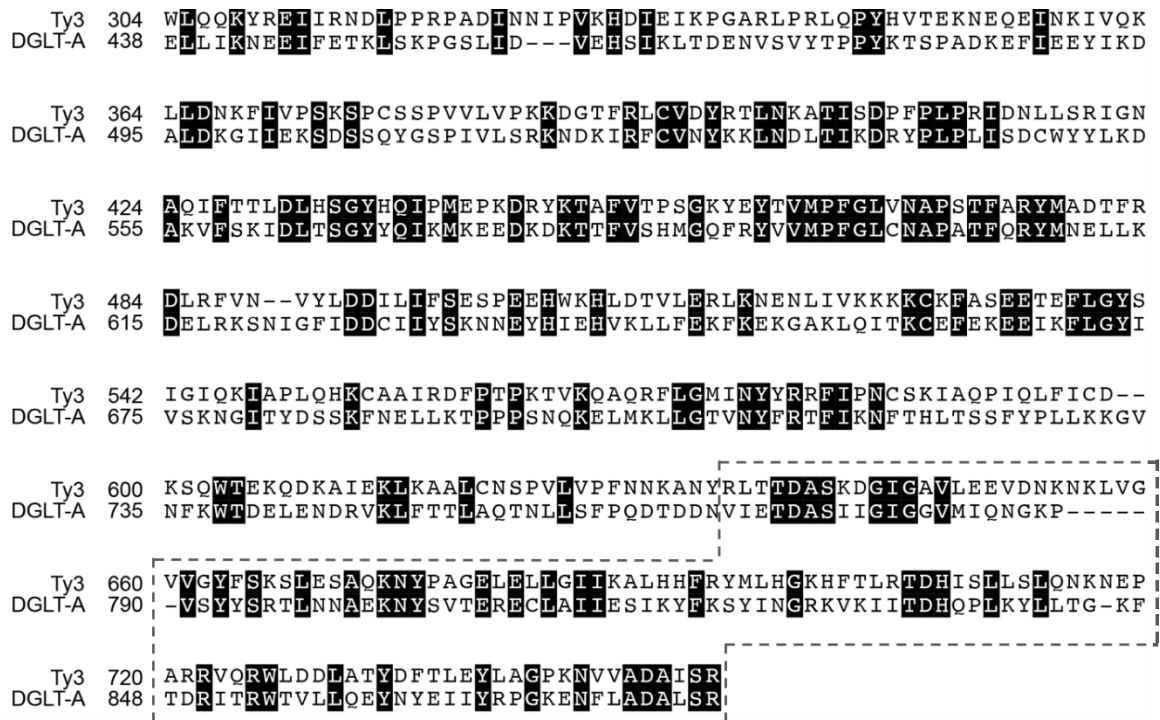


Abbildung 21: Alignment der RT-RNH-Domänen von DGLT-A und Ty3

Die Nummern definieren die entsprechenden Aminosäurepositionen im DGLT-A-ORF und dem Ty3-POL3-Polypeptid. Identische Aminosäurepositionen sind schwarz unterlegt und machen in diesem Alignment 35,5 % aus. Der umrandete, gestrichelte Abschnitt markiert die RNH.

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zwischen DGLT-A und Ty3 und der Tatsache, dass beide Elemente in gleicher Position vor tRNA-Gene integrieren, wird in diesem Teil der Arbeit untersucht, ob auch beide Elemente, trotz ihrer evolutionären Distanz, den gleichen molekularen Mechanismus verwenden um gezielt im Genom zu integrieren. Aus den Untersuchungen mit Ty3 ist bekannt, dass dieses Element Interaktionen mit den Proteinen des Präinitiationskomplexes der RNA-Polymerase III eingeht. Nachfolgend wird somit analysiert, ob auch DGLT-A aus *D. discoideum* für seine gezielte Integration Transkriptionsfaktoren der RNA-Polymerase III nutzt.

3.2 Das Polyprotein von DGLT-A

Um mögliche Interaktionspartner zwischen Domänen des Polyproteins von DGLT-A und den Transkriptionsfaktoren der RNA-Polymerase III (POLIII) in *D. discoideum* identifizieren zu können, wurde das Hefe-Zwei-Hybrid-System verwendet. Hierfür wurde basierend auf vorangegangenen Arbeiten das Polyprotein von DGLT-A in seine individuellen Domänen unterteilt und diese einzeln in die Hefektoren pACT2 und pGBKT7 kloniert (siehe Anhang).

Das gruppenspezifische-Antigen (GAG) umfasst die Aminosäuren 2-236, die Protease (PR) deckt den Bereich 231-425 ab. Die Aminosäuren 419-742 definieren die Reverse Transkriptase (RT), an die die Ribonuklease-H (RNH) im Bereich von 733-879 Aminosäuren grenzt. Die Integrase (Aminosäuren 994-1437) wurde in drei Teile aufgeteilt. Der mittlere Teil umfasst, mit Aminosäureposition 1148-1313, die *catalytic core domain* (CCD). In diesem Teil befindet sich eine katalytische DD(35)E-Domäne, während in der C-terminalen-Domäne (CTD) ein GPY/F-Motiv zu finden ist. Beide Motive sind wichtige Merkmale der Integrase von Retrotransposons und Retroviren (Khan *et al.* 1991, Malik und Eickbush 1999). Die N-terminale Domäne (NTD), welche die Aminosäuren von Position 994-1147 definiert, beinhaltet an deren Ende (Aminosäuren 1068-1147) ein typisches Zinkfinger-ähnliches Motiv (HHCC). Eine Unterteilung der NTD erfolgte nochmals in NED (*N-terminal extension domain*) (Aminosäureposition 994-1067) und ZF (Zinkfinger-ähnliches Motiv) (siehe Abbildung 22).

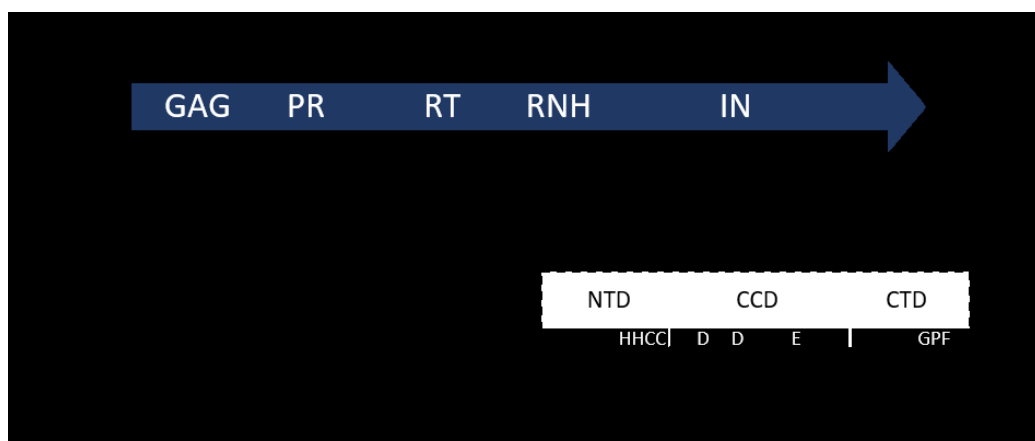


Abbildung 22: Schematische Darstellung von DGLT-A mit Aminosäurepositionen der einzelnen Domänen des Polyproteins

Aminosäurepositionen der einzelnen Domänen des DGLT-A-GAG-POL-Polypeptids. Die Integrase wurde in drei Domänen unterteilt. Die CCD (*catalytic core domain*), die CTD (*C-terminal domain*) und die NTD (*N-terminal domain*). Die NTD wurde zudem nochmal in NED (*N-terminal extension domain*) und ZF (*zinc finger*) Region unterteilt. GAG: *group-specific antigen*; PR: Protease, RT: Reverse Transkriptase; RNH: RNase-H-Domäne; IN: Integrase; LTR: *long-terminal repeats*; PB: tRNA-Primer-Bindestelle; PPu: Polypurin-Bindestelle

3.2.1 Die RT-RNH-Domäne von DGLT-A

Die Reverse Transkriptase (RT) ist für die Bildung der doppelsträngigen DNA aus dem RNA-Intermediat der Retroelemente während der Transposition verantwortlich (Boeke und Corces 1989). Ein wesentlicher Bestandteil dieser RT-Domäne ist, neben der DNA-Polymerase, die Ribonuklease-H (RNH), welche für die Degradierung der RNA nach der Erststrang-DNA-Synthese verantwortlich ist. Um analysieren zu können, wie die RT-RNH-Domäne und speziell die RNH aus DGLT-A aussehen könnte, wurde ein Vergleich mit der kürzlich entdeckten und veröffentlichten Struktur der RT-RNH-Domäne von Ty3 aus *S. cerevisiae* gezogen. Aus dem Alignment in Abbildung 23A geht hervor, dass die RT-RNH-Domänen zwischen den zwei Retrotransposons zu 35,5 % identisch zueinander sind. Die Domäne der DNA-Polymerase ähnelt in ihrer räumlichen Struktur einer rechten Hand und wird demnach danach eingeteilt. Als „Handfläche“ (*palm*) wird der Bereich des aktiven Zentrum definiert, der Bereich „Finger“ (*fingers*) stabilisieren die RNA und der als „Daumen“ (*thumb*) definierte Bereich interagiert hauptsächlich mit dem DNA-Strang (Nowak *et al.* 2014) (siehe Abbildung 23B und C). Die auf die veröffentlichte Kristallstruktur von Ty3, mit der PDB-ID 4OL8, modellierte Struktur der RT-RNH-Domäne von DGLT-A zeigt den gleichen Aufbau in diesen Bereichen. Auffallend ist zudem der strukturelle Aufbau der RNH-Domänen zwischen Ty3 und DGLT-A. Diese sind zu 33,9 % identisch zueinander (Abbildung 23A, orange-farbiger Kasten) und zeigen eine gleiche Anordnung der α -Helices und β -Faltblätter.

A

Ty3 304 W L Q Q K Y R E I I R N D L P P R P A D I N N I P V K H D I E I K P G A R L P R L Q P Y H V T E K N E Q E I N K I V Q K
DGLT-A 438 E L L I K N E I I F E T K L S K P G S L I D - - - V E H S I K L T D E N V S V Y T P P Y K T S P A D K E F I E E Y I K D

Ty3 364 L L D N K F I V P S K S P C S S P V V L V P K K D G T F R L C V D Y R T L N K A T I S D P F P L P R I D N L L S R I G N
DGLT-A 495 A L D K G I I E K S D S S Q Y G S P I V L S R K N D K I R F C V N Y K K L N D L T I K D R Y P L P L I S D C W Y Y L K D

Ty3 424 A Q I F T T L D L H S G Y H Q I P M E P K D R Y K T A F V T P S G K Y E Y T V M P F G L V N A P S T F A R Y M A D T F R
DGLT-A 555 A K V F S K I D L T S G Y Y Q I K M K E E D K D K T T F V S H M Q G F R Y V V M P F G L C N A P A T F Q R Y M N E L L K

Ty3 484 D L R F V N - - V Y L D D I L I F S E S P E E H W K H L D T V L E R L K N E N L I V K K K K C K F A S E E T E F L G Y S
DGLT-A 615 D E L R K S N I G F I D D C I I Y S K N N E Y H I E H V K L L F E K F K E K G A K L O I T K C E F E K E E I K F L G Y I

Ty3 542 I G I Q K I A P L Q H K C A A I R D F P T P K T V K Q A Q R F L G M I N Y Y R R F I P N C S K I A Q P I Q L F I C D - -
DGLT-A 675 V S K N G I T Y D S S K F N E L L K T P P S N O K E L M K L L G T V N Y F R T F I K N F T H L T S S F Y P L L K K G V

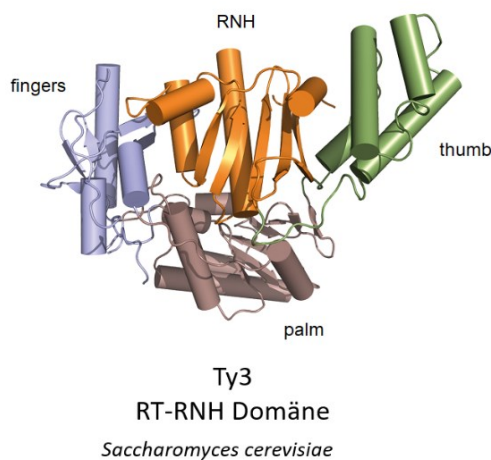
RNH

Ty3 600 K S Q W T E K Q D K A I E K L K A A L C N S P V L V P F N N K A N Y R L T T D A S K D G I G A V L E E V D N K N K L V G
DGLT-A 735 N F K W T D E L E N D R V K L F T T L A Q T N L L S F P Q D T D D N V I E T D A S I I G I G G V M I Q N G K P - - - -

Ty3 660 V V G Y F S K S L E S A Q K N Y P A G E L E L G I I K A L H H F R Y M L H G K H F T L R T D H I S L L S L Q N K N E P
DGLT-A 790 - V S Y S R T L N N A E K N Y S V T E R E C L A I I E S I K Y F K S Y I N G R K V K I I T D H Q P L K Y L L T G - K F

Ty3 720 A R R V O R W L D D L A T Y D F T L E Y L A G P K N V V A D A I S R
DGLT-A 848 T D R I T R W T V L L Q E Y N Y E I I Y R P G K E N F L A D A I S R

B



C

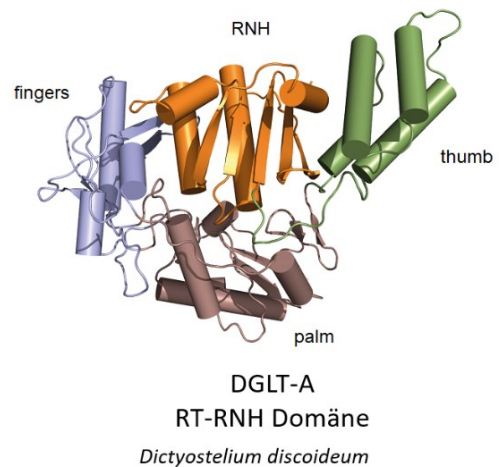


Abbildung 23: RT-RNH-Domänen von Ty3 und DGLT-A im Vergleich

A: Alignment der RT-RNH-Domänen von Ty3 aus *S. cerevisiae* und DGLT-A aus *D. discoideum*. Die angegebenen Nummern beziehen sich auf die Aminosäurepositionen in dem jeweiligen Polypeptid. Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt. Der orange-markierte Bereich kennzeichnet den Bereich der RNH. **B:** Kristallstruktur der RT-RNH-Domäne aus Ty3 basierend auf der Veröffentlichung von Nowak *et al.* 2014 (PDB 4OL8). **C:** Modellierter Struktur der RT-RNH-Domäne aus DGLT-A. Das Modell wurde mit Hilfe von PyMol und PDB 4OL8 generiert.

3.2.2 Die Integrase-Domäne von DGLT-A

Die Integrase-Domäne von Ty3 kann in drei Subdomänen unterteilt werden. Die *catalytic core* Domäne (CCD) besitzt das aktive Zentrum mit dem typischen D, D₃₅-E Motiv. Die N-terminale Domäne (NTD) zeigt ein Zinkfinger-(HH-CC)-Motiv, das für die Bindung an LTR-Sequenzen benötigt wird, jedoch nicht für die spezifische Integration von Ty3 verantwortlich ist (Khan *et al.* 1991) und die C-terminale Domäne (CTD), welche ein GPY/F-Motiv zeigt (Malik und Eickbush 1999). Diese speziellen Motive innerhalb der Integrase sind nicht nur bei Ty3 zu finden, sondern generell innerhalb der Ty3/Gypsy-Gruppe einiger LTR-Retrotransposons und Retroviren. Ein Alignment zwischen der Integrase-Domäne von Ty3 und DGLT-A in Abbildung 24 zeigt, dass die typischen, konservierten Motive auch in der DGLT-A-Integrase präsent sind.

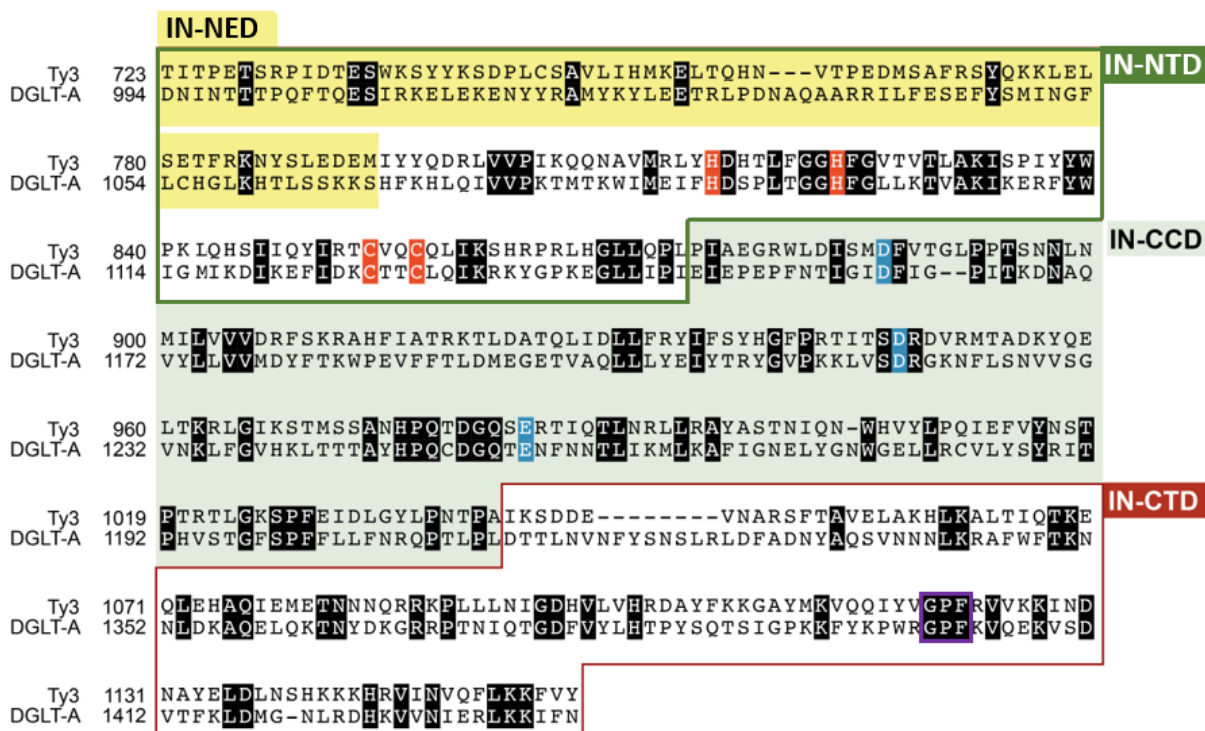


Abbildung 24: Alignment zwischen der Integrase-Domäne von Ty3 und DGLT-A

Vergleich der Integrase-Domäne von Ty3 und DGLT-A. Die Zahlen beziehen sich auf die Aminosäurepositionen im jeweiligen Polypeptid. Identische Aminosäurepositionen sind schwarz unterlegt. IN-NTD: N-terminale Domäne, IN-CCD: *catalytic core* Domäne, IN-CTD: C-terminale Domäne.

Der rot-umrandete Bereich definiert die C-terminale Domäne (CTD) der Integrase. Diese zeigt am wenigsten konservierte Bereiche zwischen Ty3 und DGLT-A, hat jedoch das typische

GPF-Motiv (Abbildung 24, lila Kasten). Davor befindet sich die *catalytic core* Domäne (CCD). Auch hier ist das aktive Zentrum des Enzyms mit dem typischen D, D₃₅-E-Motiv zu sehen. Die drei sauren Aminosäuren (DDE) der katalytischen Triade sind in Abbildung 24 blau unterlegt. Der N-terminale Teil (NTD) ist grün umrandet. Das Zinkfinger Motiv innerhalb der NTD ist auch bei DGLT-A vertreten (Abbildung 24, rot-unterlegte Aminosäuren). Dieser Bereich umfasst bei den meisten Retroviren ca. 50 Aminosäuren. Bei Ty3 und DGLT-A ist das N-terminale Ende der NTD um ca. 70 Aminosäuren verlängert. Dieser Bereich, in Abbildung 24 gelb hinterlegt, wird als NED definiert (*N-terminal extension domain*) und ist bei Ty3 für die Interaktion mit der TFIIIC Untereinheit Tfc1 verantwortlich (Aye *et al.* 2001). Umso interessanter ist es zu sehen, dass auch DGLT-A über eine solche N-terminale Verlängerung verfügt. Trotz der geringen Sequenzähnlichkeit in diesem Bereich könnte angenommen werden, dass auch die Integrase-Subdomäne IN-NED von DGLT-A eine Interaktionsfläche bietet und somit zur spezifischen Integration von DGLT-A beitragen könnte.

3.3 Die TFIIIC-Untereinheit Tfc4 aus *Dictyostelium discoideum*

Charakteristisch für Tfc4-Proteine sind ihre TPRs (*tetratricopeptide repeats*). Ein TPR besteht meist aus ca. 34 Aminosäuren, die als zwei antiparallel zueinander laufende alpha-Helices auftreten. Es wird häufig beobachtet, dass Proteine mehrere dieser TPR-Motive besitzen und diese in sogenannten Reihen oder *Arrays* auftreten (Zeytuni und Zarivach 2012). Diese aneinandergereihten Motive bieten somit eine gute Fläche zur Interaktion mit anderen Proteinen. So suggerierten ältere *in silico* Strukturanalysen, dass die Tfc4 Untereinheit - auch $\tau 131$ genannt – aus *S. cerevisiae* 11 dieser TPRs enthält, von denen 9 in zwei zentrale TPR-Arrays aufgeteilt werden können. Die erste Reihe deckt die TPRs 1-5 ab, die zweite Aneinanderreihung erfolgt zwischen den TPRs 6-9 (Marck *et al.* 1993). Um Tfc4 im Hefe-Zwei-Hybrid-System testen zu können, sollte das Protein so unterteilt werden, dass die TPR-Regionen basierend auf Sekundärstrukturvorhersagen in die TPR-Arrays 1-5 und 6-9 separiert werden konnten. Letztlich wurde das Tfc4-Protein in die Aminosäure-Bereiche 2-219, 219-478, 446-608 und 628-997 aufgeteilt (siehe Abbildung 25A) und für Interaktionsanalysen mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System an die DNA-Bindedomäne (BD) von Gal4 fusioniert.

Eine spätere Analyse der Kristallstruktur des TPR-Arrays der Tfc4-Untereinheit aus *S. cerevisiae* ließ jedoch überraschenderweise erkennen, dass sich die Tfc4-Untereinheit aus 12 anstatt 11 TPRs zusammensetzt und dass eine klare Aufteilung in zwei zentrale *Arrays* schwierig ist (Male *et al.* 2015), da sich der zuvor postulierte *Linker* zwischen beiden *Arrays* als eine Verlängerung, eine erweiterte Helixstruktur, des TPR 5 herausstellte (siehe Abbildung 25B). Die Untereinheit Tfc4 aus *S. cerevisiae* mit ihren TPRs bietet damit eine große Interaktionsfläche für andere Proteine an. So bietet sie eine Plattform für die Interaktion mit der Untereinheit Tfc3 und erleichtert somit die korrekte Formation des gesamten TFIIC/TFIIIB-Komplexes, ist aber auch zuständig für die Rekrutierung der Untereinheiten Brf1 und Bdp1 aus dem TFIIIB-Komplex (Chaussivert *et al.* 1995, Dumay-Odelot *et al.* 2002, Liao *et al.* 2003, Rozenfeld und Thuriaux 2001).

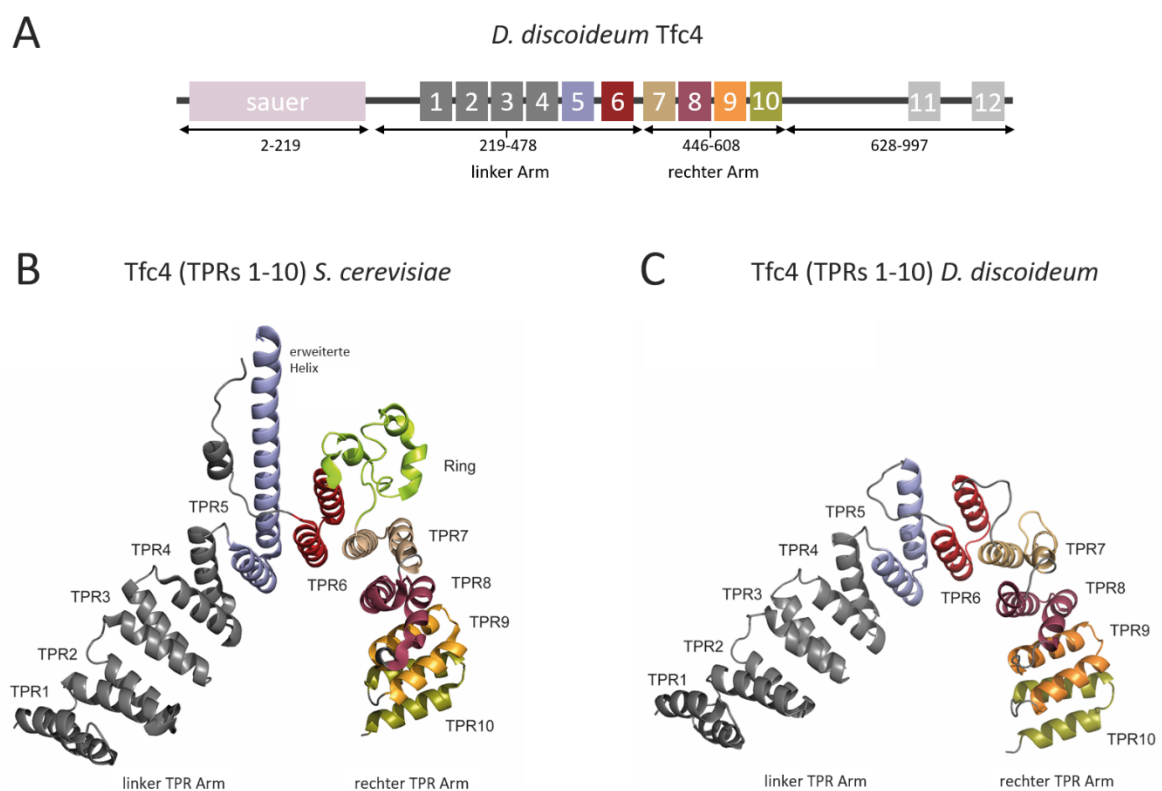


Abbildung 25: Vergleich der Strukturen der zentralen TPRs 1-10 von Tfc4 aus *S. cerevisiae* und *D. discoideum*

A: Schematische Anordnung der TPR-Domänen von *D. discoideum*-Tfc4. Die angegebenen Pfeile mit den jeweiligen Aminosäurepositionen kennzeichnen die vereinzelt und klonierten Fragmente, welche im Hefe-Zwei-Hybrid-System getestet wurden. Hauptaugenmerk liegt hier auf den zentralen TPRs 1-10, deren Farbkodierungen identisch zu denen der Strukturen darunter sind. **B:** Kristallstruktur von Tfc4-TPRs 1-10 aus *S. cerevisiae*, dargestellt als Bändermodell. **C:** Modellierter Struktur von Tfc4-TPRs 1-10 aus *D. discoideum*. Das Modell wurde mit Hilfe der veröffentlichten Struktur von Male *et al.* 2015 (PDB 5AIO) und mit PyMol generiert.

Das Strukturmodell der TPRs 1-10 aus Tfc4 von *S. cerevisiae* zeigt, dass das TPR-Array in zwei Arme aufgeteilt werden kann (siehe Abbildung 25B). *S. cerevisiae*-Tfc4 (TPR 1-10) zeigt zudem eine erweiterte Helixstruktur von TPR 5 und eine ungeordnete Windung im Zentrum, welche als „Ringdomäne“ definiert wird. Diese beiden Strukturen verursachen eine Art Knick im Protein und bringen die TPRs des rechten Arms näher an die TPRs des linken Arms, was Tfc4 eine hohe Flexibilität verleiht und die Fähigkeit, mehrere Interaktionspartner zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu binden (Male *et al.* 2015).

Die TFIIIC-Untereinheit Tfc4 aus *D. discoideum* mit der dictyBase-ID DDB_G0278321 besteht aus 997 Aminosäuren, besitzt eine saure Domäne am N-Terminus und wie das Hefe-Ortholog 12 TPR-Motive, die im Wesentlichen in zwei TPR-Arrays zusammengefasst sind (siehe Abbildung 25A). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der TPR 1-10-Region aus Tfc4 zwischen *D. discoideum* und *S. cerevisiae* zeigt, dass diese zu 21 % identisch zueinander sind. Daraufhin konnte, basierend auf der veröffentlichten Kristallstruktur des *S. cerevisiae*-Tfc4 (TPRs 1-10) von Male *et al.* 2015 ein Strukturmodell der zentralen TPRs 1-10 von *D. discoideum*-Tfc4 generiert werden (siehe Abbildung 25C). Es zeigt, dass bei dem *D. discoideum*-Tfc4 im Vergleich zum Hefe-Protein die erweiterte Helixstruktur und die „Ringdomäne“ fehlen. Auch das generierte strukturbasierte Alignment zwischen Ty3 und DGLT-A lässt das erkennen (siehe Abbildung 26). Trotzdem weisen die modellierten TPRs 1-10 wie in Abbildung 25C dargestellt, vermutlich ebenso einen Knick im Zentrum auf, der das Protein, gleich wie bei *S. cerevisiae*, in einen linken und einen rechten Arm aufteilt. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass auch hier eine gewisse Flexibilität herrscht um mehrere Proteininteraktionen gleichzeitig eingehen zu können.

| | | | | | |
|--------|-----|---|--|--|-------------|
| | | TPR1 | | TPR2 | |
| DdTfc4 | 233 | KLLVGGNEQYTKGNFDLAFSTYAEVVRMLP | | RLSIPYNIILGKIKESOGEMEAAALGFYVYGAQMO | |
| ScTfc4 | 130 | QLLSQANEAFVRNDLQVAERLFNEVIKKDAR | | NFNAAYETLGDIIYQLOGRNDCCNSWFLAAHLN | |
| | | TPR3 | | TPR4 | |
| DdTfc4 | 296 | GSNGD-WSSIGVRAKEAGOMETALYCFSRACRNDET | | DLDSFWEKSLILIQKGFYKRALKILTK | |
| ScTfc4 | 193 | ASDWEFWKIVAILSADLDHVRQATYCFSRVISLNP | | MEWESIYRRSMLYKKTGQLARALDGFQR | |
| | | TPR5 | | erweiterte Helix | |
| DdTfc4 | 358 | LSKYTNQSPQVLOELARVYSHLSQYHDASAMISEVDEQLI | | ----- | |
| ScTfc4 | 256 | LYMYNPYDANILRELAILYVDYDRIEDSIELYMKVFANVER | | RREAILAALENALDSSDEESAA | |
| | | | | TPR6 | |
| DdTfc4 | 399 | -----SNKSLDDVS | | LDSVNLMMELKNKTRNYQDTITIFN | |
| ScTfc4 | 319 | EGEADAKEPLEQDEDRQMFDPINWKKIDAKYKCIPFD | | WSLNLILAEFLKLAVSEVDGIKTI | |
| | | Ring | | TPR7 | |
| DdTfc4 | 433 | KITAKYG-----NDSEVP | | FDLVFNACQAYYSL | |
| ScTfc4 | 382 | KKCARWIORRESQTFWDHVPDDSEFDNRRFKNSTFDSLAAEKEKSYNIP | | PIDIRVRLGLLRLN | |
| | | | | TPR8 | TPR9 |
| DdTfc4 | 460 | GTDFGNERGSKLLHLRLPLDP | | SEYGDLFSTSLADELFALGKYQDALVVYLHLK-DTDFDIPSN | |
| ScTfc4 | 445 | TDNLVEALNHFQCLYDE---TF | | SDVADLYFEAATATRAEKYKEAIDFFTPPLLSLEEWRTTDV | |
| | | | | TPR10 | |
| DdTfc4 | 521 | WVKIADIHRSTKNYEVAIEFYFSKANERV | | PGNVHTTLAMSEIYKEMGDEKALQILNQSSTISN | |
| ScTfc4 | 504 | FKPLARCYKEIESYETAKEFYELAIKSEP | | DDLDIRVSLAEVYVYRLNDPETFKHMLVDVVMERK | |

Abbildung 26: Strukturbasiertes Alignment der TPRs 1-10 aus Tfc4 zwischen *D. discoideum* und *S. cerevisiae*

Das Alignment basiert auf der veröffentlichten Struktur von Tfc4 (TPRs 1-10) von *S. cerevisiae* (PDB 5AIO) auf die die Sequenz von *D. discoideum* (dictyBase-ID: DDB_G0278321) modelliert wurde. Identische Aminosäurepositionen sind schwarz unterlegt. Die einzelnen TPRs sind mit unterschiedlichen Farben definiert.

DdTfc4: *Dictyostelium discoideum*-Tfc4, ScTfc4: *Saccharomyces cerevisiae*-Tfc4

3.4 Interaktionen zwischen DGLT-A-Proteinen und Transkriptionsfaktoren der Polymerase III

Mittels des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems wurden die Protein-Protein Interaktionen zwischen den funktionellen Domänen von DGLT-A und den RNA-Polymerase III-Transkriptionsfaktoren genauer untersucht. Eine vorangegangene Arbeit von J. Schiefner führte bereits zu dem vorläufigen Ergebnis, dass DGLT-A mit der Untereinheit Tfc4 des Faktors TFIIIC interagieren könnte (Schiefner 2014). Dafür wurde das Polyprotein von DGLT-A, wie in Abbildung 22 gezeigt, in seine individuellen Domänen unterteilt. Die jeweiligen Fragmente wurden daraufhin in die Hefevektoren pGBKT7 und pACT2 kloniert (siehe Anhang). Beide Plasmide besitzen jeweils eine Domäne des *GAL4*-Gens aus *S. cerevisiae*. GAL-4 ist ein Transkriptionsfaktor, der aus zwei separaten, essenziellen Domänen besteht. Einer N-terminalen Domäne, welche an eine spezifische Sequenz innerhalb der DNA bindet

(DNA-BD) und einer C-terminalen Domäne, welche für die Aktivierung der Transkription notwendig ist (AD) (Fields und Song 1989). Diese beiden Domänen wurden in die Hefektoren pGBKT7 und pACT2 aufgeteilt. In pGBKT7 klonierte Proteine wurden an die DNA-BD von GAL4 fusioniert, wohingegen in pACT2 klonierte Proteine an die Aktivierungsdomäne (AD) gekoppelt waren. Für die Analyse möglicher Interaktion zweier Proteine, wurden diese in ihren jeweiligen Vektoren in den Hefestamm AH109 transformiert und die Zellen daraufhin auf Minimalmedium inkubiert (siehe 2.2.3.7). Wurde nach einigen Tagen ein Wachstum der Hefezellen beobachtet, wurde davon ausgegangen, dass eine Interaktion der beiden Proteine stattfand, da nur dann eine Rekonstruktion des GAL-4 Transkriptionsfaktors möglich war und dadurch die Transkription essenzieller Gene aktiviert werden konnte. Um das Ergebnis abzusichern wurden anschließend beide Plasmide wieder aus den Hefezellen isoliert und ihre Identität bestätigt. Dieses sogenannte *Plasmidrescue* wurde für jede der aufgeführten Interaktionen in dieser Arbeit durchgeführt.

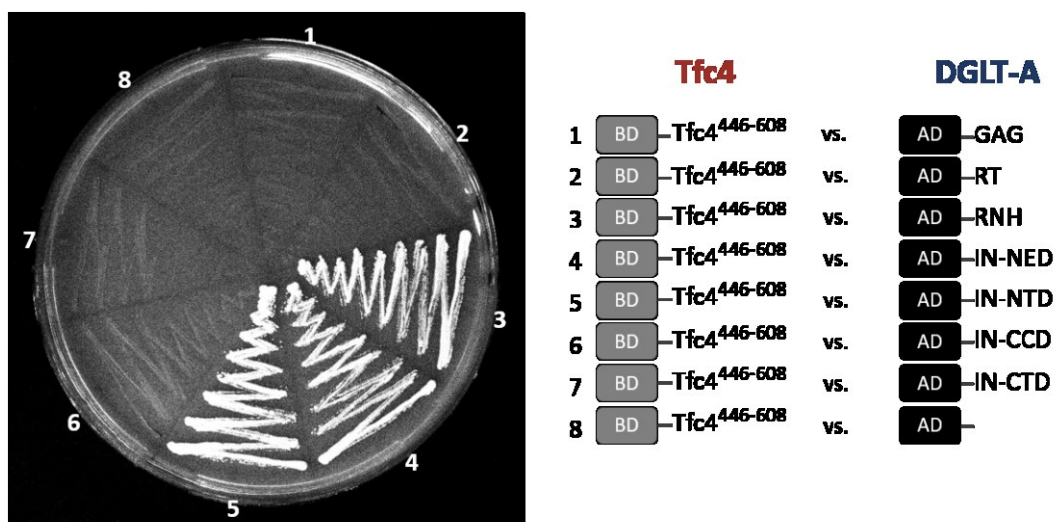


Abbildung 27: Interaktionen zwischen Tfc4 (446-608) und funktionellen Domänen des Polyproteins von DGLT-A

Nachweise von Protein-Protein-Interaktionen in *D. discoideum* mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System. Tfc4 (446-608) wurde an die DNA-Bindedomäne (BD) fusioniert und gegen die einzelnen an die Aktivierungsdomäne (AD) fusionierten funktionellen Domänen des Polyproteins von DGLT-A getestet.

Abbildung 27 zeigt ein Wachstum der Hefezellen und damit eine Interaktion zwischen der Untereinheit Tfc4 (Aminosäurebereich 446-608) und funktionellen Domänen von DGLT-A. Dieser Bereich der Tfc4-Untereinheit deckt die TPRs 7-10 ab, welche unter Abschnitt 3.3

genauer beschrieben werden. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass die Interaktionsfläche von Tfc4 auf den TPRs 7-10 liegt, da eine Interaktion mit den anderen Aminosäurebereichen nicht beobachtet wurde. Zudem wurde eine Interaktion zwischen der Integrase und Tfc4(446-608) festgestellt, wenn die vorderen N-terminalen Teile der Integrase-Domäne (NED bzw. NTD) als Interaktionspartner zur Verfügung standen. Interessant war zudem die robuste Interaktion zwischen Tfc4 (446-608) und der Ribonuklease-H (RNH), da Interaktionen zwischen Reverser Transkriptase (RT) bzw. RNH und Integrase vor allem bei Retroviren beobachtet werden können (Skalka und Goff 1993, Steele und Levin 1998).

Anhand dieser Ergebnisse ließen sich die Interaktionspartner, welche möglicherweise für die spezifische Integration von DGLT-A in das Genom von *D. discoideum* verantwortlich sind, auf Integrase (NED bzw. NTD-Teil), RNH und Tfc4 (446-608) eingrenzen.

3.4.1 Interaktionen der DGLT-A-RNH

3.4.1.1 Interaktionen zwischen Tfc4 und DGLT-A-RNH

Die RNH von DGLT-A besitzt die auch bei Retroviren zu findenden fünf β -Faltblätter, die im Zentrum des Proteins liegen. Die ersten drei β -Faltblätter sind länger und verlaufen antiparallel, während die letzten zwei kürzer sind und parallel zum ersten β -Faltblatt stehen. Zudem besitzt das Protein zwei erweiterte α -Helices, die jeweils um die fünf zentralen Faltblätter liegen (siehe Abbildung 28A). Bei den unter 3.4 erlangten Ergebnissen wurden die Versuche mit einem RNH-Teil aus DGLT-A durchgeführt, welcher den Aminosäurebereich 733-879 auf dem Polypeptid definiert. Nach den Erkenntnissen der modellierten Struktur der RNH wurde aber festgestellt, dass der RNH-Hauptteil (*core*) durch die Aminosäuren 759-879 definiert wird und dass Aminosäuren 733-758 einen Teil der Helix der „Daumen“-Domäne der RT repräsentiert. Deshalb wurde der Bereich 733-758 nochmals separat in die Hefevektoren kloniert, um sicher zu stellen, dass eine Interaktion dieses Fragments mit Tfc4 ausgeschlossen werden kann. Zudem wurde die RNH in mehrere Fragmente unterteilt und nochmals separat gegen Tfc4 getestet, um mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System die Interaktionsfläche eingrenzen zu können. Dafür wurde die RNH in Fragmente der Aminosäurebereiche 759-800, 801-846 und 845-879 aufgeteilt. Diese Bereiche wurden jeweils an die GAL4-AD fusioniert und gegen Tfc4 (446-608) (TPRs 7-10) getestet (siehe Abbildung 28B).

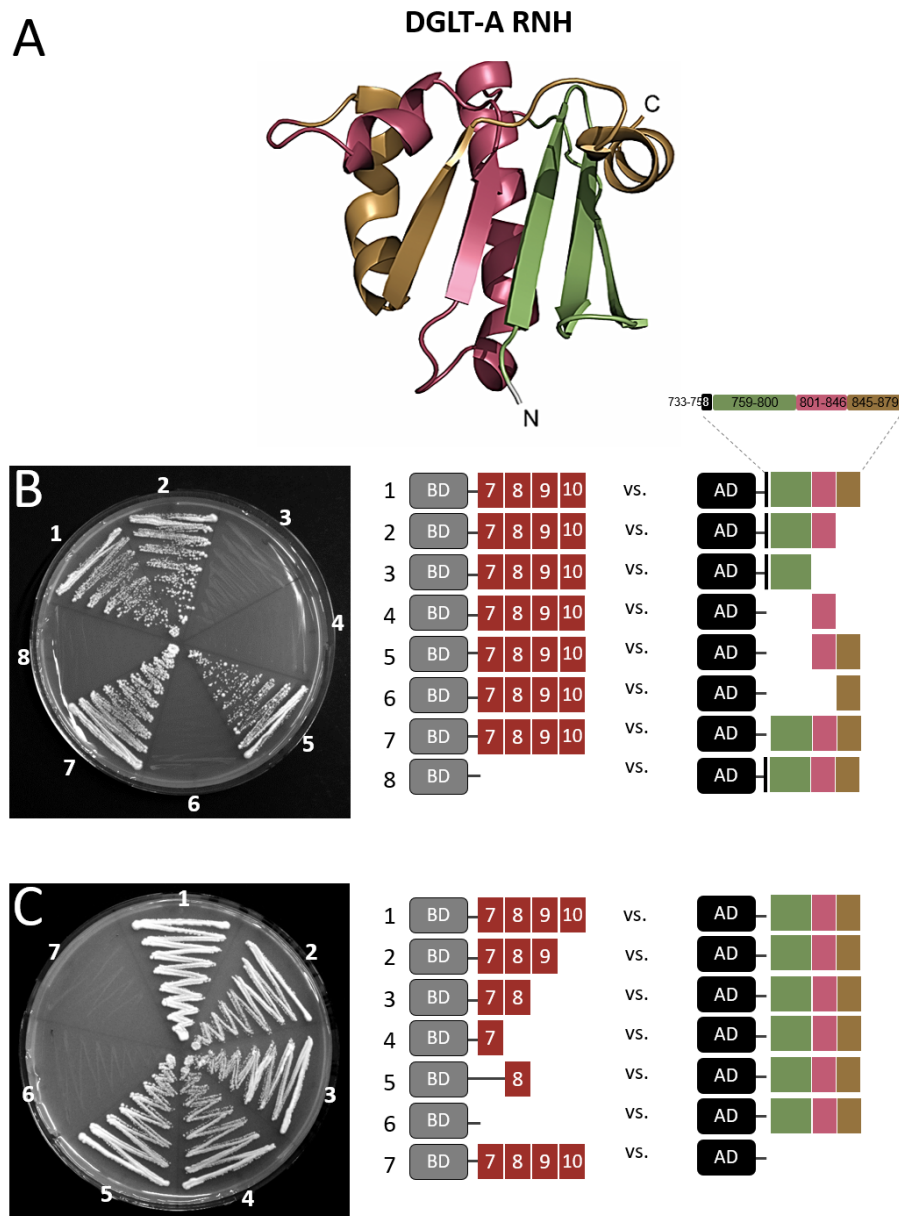


Abbildung 28: Interaktionsanalysen zwischen Tfc4 (TPRs 7-10) und DGLT-A-RNH

A: Modell der RNH-Domäne von DGLT-A. Die Struktur wurde generiert indem sie auf die veröffentlichte RT-RNH-Struktur von Ty3 (PDB 4OL8) angepasst wurde. **B:** Hefe-Zwei-Hybrid-Experimente. Tfc4 (TPR7-10) wurde gegen unterschiedliche Fragmente der RNH getestet. Die Farbkodierung entspricht den Strukturelementen in A. Der Abschnitt 733-758 (schwarz) gehört nicht zu DGLT-A-RNH, sondern zu der „Daumen“-Domäne der RT. **C:** Interaktionsanalysen via Hefe-Zwei-Hybrid-System zwischen einzelnen TPRs aus Tfc4 und der Hauptregion (core) von RNH (759-879).

Es konnte nachgewiesen werden, dass die separate Helix (733-758) aus der „Daumen“-Domäne der RT nicht mit Tfc4 interagiert, sondern eine Interaktion zwischen dem Hauptteil der RNH (759-879) und Tfc4 stattfindet (Abbildung 28B, Feld 1 und 7). Zudem konnte eine Interaktion auf den vereinzelt Flächen der RNH (759-846) und RNH (801-879) beobachtet werden. Die RNH präsentiert damit eine erweiterte, zweiteilige Interaktionsfläche, die sowohl auf dem N-terminalen, als auch auf dem C-terminalen Teil des Proteins sitzen kann.

Zusätzlich wurde untersucht, ob die Interaktionsfläche von Tfc4, der TPRs 7-10, eingegrenzt werden kann. Dafür wurde überprüft, welche TPRs eine Interaktion mit der kompletten (*core*) RNH-(759-879)-Domäne eingehen können. Das Ergebnis in Abbildung 28C zeigt, dass dies mit dem isolierten TPR 7 und TPR 8 der Fall ist und die Interaktionsfläche von Tfc4 somit auf diese beiden TPRs reduziert werden kann. Um diesen Befund zu bestätigen, wurde das vereinzelt TPR 7 und TPR 8 gegen die unterschiedlichen Fragmente von RNH getestet (siehe Abbildung 29).

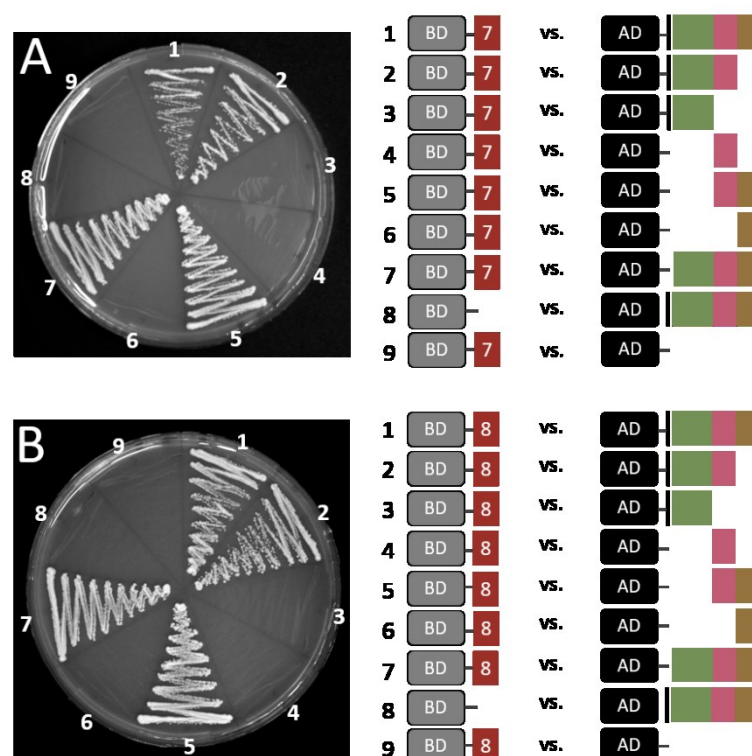


Abbildung 29: Interaktionsanalyse zwischen TPR 7 und TPR 8 gegen DGLT-A RNH-Fragmente

A: Tfc4-TPR 7 wurde im Hefe-Zwei-Hybrid System gegen unterschiedliche Fragmente der DGLT-A-RNH-Domäne getestet. **B:** Gleicher Aufbau des Hefe-Zwei-Hybrid-Experiments. Hier wurde TPR 8 an die BD fusioniert und gegen verschiedene DGLT-A-RNH-Fragmente getestet. Farbkodierungen stimmen mit denen in Abbildung 28 überein.

Es wurde deutlich, dass TPR 7 und TPR 8 an die gleichen RNH-Fragmente bindet. Sowohl der N-terminale Teil der RNH als auch der C-terminale Teil geht eine Interaktion mit den vereinzelt TPRs (Abbildung 29A und B Felder 2 und 5) ein, was eine unabhängige Bindung der RNH mit einem oder beiden TPRs wahrscheinlich macht. Eine weitere Bestätigung dieser Hypothese entsteht beim Vergleich mit dem Ergebnis aus Abbildung 28B. Auch hier sind es die gleichen RNH-Fragmente, die mit dem gesamten TPR-Array 7-10 interagieren. Es lässt sich daher vermuten, dass TPR 7 und TPR 8 ähnliche Interaktionsflächen für die RNH anbieten, obwohl konservierte Sequenzbereiche zwischen den beiden TPRs sehr begrenzt sind (siehe Alignment Abbildung 26).

Um die Protein-Protein-Interaktion zwischen Tfc4 (446-608) und RNH *in vitro* zu bestätigen wurden *Pulldown*-Experimente durchgeführt. Dafür wurden die DNA-Fragmente von Tfc4 (446-608) und RNH (733-879) heterolog in Bakterien exprimiert. Die Proteine wurden mit einem *His₆-Tag* versehen, um eine spätere Proteinaufreinigung via Ni^{2+} /NTA-Säule zu ermöglichen. Separat wurde jedes Protein mit einem 3xFLAG-Tag (DYKDDDDK) oder einem GFP-Tag versehen. Beide Tags wurden jeweils an den N-Terminus der Proteine fusioniert. Der *Pulldown* erfolgte mittels ANTI-FLAG® M2 *Magnetic Beads*. Die exprimierten FLAG-markierten Proteine wurden an die FLAG-*Beads* gebunden, bevor der potentielle GFP-markierte Interaktionspartner dazugegeben wurde. Von einer Interaktion zwischen den Proteinen konnte man ausgehen, wenn nach dem Ziehen an den magnetischen FLAG-*Beads* sowohl das FLAG-markierte, als auch das GFP-markierte Protein mittels Western Blot und anschließender Immunodetektion nachweisbar waren.

Es konnte via *Pulldown*-Experimente bestätigt werden, dass die RNH (733-879) eine Interaktion mit Tfc4 (446-608) eingeht. Das linke Feld in Abbildung 30 zeigt die ersten beiden Spuren als *Input*. Dabei handelt es sich um die aufgereinigten heterolog exprimierten Proteine, von denen jeweils 10 % abgezogen wurden, bevor der Rest der Proteinlösung zur Durchführung des *Pulldowns* diente. Die dritte Spur im ersten Feld zeigt den Nachweis der Interaktion zwischen Tfc4 und RNH *in vitro*. Hier wurde FLAG-Tfc4 an *Beads* gebunden, an die Anti-FLAG-Antikörper fusioniert sind. GFP-RNH wurde daraufhin mit den FLAG-Tfc4-*Beads* inkubiert und der FLAG-Tfc4-RNH-GFP-Komplex wurde danach präzipitiert. Nach dem Western Blot wurden die Proteine zuerst mit Anti-GFP-Antikörper gefärbt bevor sie mit einem Anti-FLAG-Antikörper inkubiert wurden.

Tfc4 vs. RNH

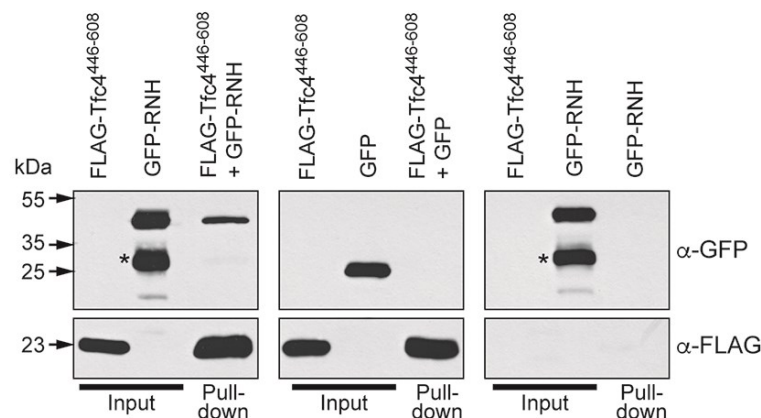


Abbildung 30: Pulldown-Experiment zwischen Tfc4 und RNH

Analyse der Interaktion zwischen Tfc4 (446-608) und RNH (733-879) mittels *Pulldown*. Tfc4 war FLAG-markiert und ist 22,9 kDa groß. Es wurde an die *Beads* gebunden und konnte mit einem Anti-FLAG-Antikörper detektiert werden. RNH war GFP markiert und zeigt eine Größe von 46,7 kDa. Es wurde mit einem Anti-GFP-Antikörper nachgewiesen. Das Set zeigt drei Felder. In dem linken Feld ist der *Pulldown* zwischen FLAG-Tfc4 und GFP-RNH gezeigt. Die beiden weiteren Felder zeigen jeweils Möglichkeiten der Negativkontrolle. Sterne: teilweise Degradierung des GFP-RNH-Protein.

Die dritte Spur im ersten Feld zeigt demnach sowohl den Nachweis des an die *Beads* gebundenen FLAG-Tfc4 (22,9 kDa), als auch den Interaktionspartner GFP-RNH (46,7 kDa). Das zweite Feld zeigt die erste Negativkontrolle. Hier wurde wie oben beschrieben FLAG-Tfc4 an die *Beads* gebunden und analysiert, ob das GFP-Protein unspezifisch mit den *Beads* oder Tfc4 interagiert. Nach der Anti-GFP-Färbung konnte keine Bande detektiert werden (dritte Spur) und es konnte somit ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Interaktion unspezifisch durch GFP verursacht wird. Für die zweite Negativkontrolle wurde kein FLAG-Tfc4-Protein an die *Beads* gebunden, weshalb kein Input auf der ersten Spur und keine Ladekontrolle auf der dritten Spur in Abbildung 30 zu sehen ist. Hier sollte gezeigt werden, dass das GFP-RNH-Konstrukt keine Interaktion mit den reinen *Beads* eingeht. Das Ergebnis zeigte, dass kein GFP-RNH an die unbeladenen *Beads* gebunden wurde. Die zwischen FLAG-Tfc4 und GFP-RNH beobachtete Interaktion kann somit als spezifisch betrachtet werden.

3.4.1.2 Interaktionen innerhalb der DGLT-A-RNH

Die neusten Erkenntnisse über die RT von Ty3 lassen vermuten, dass dieses Enzym, bei Anwesenheit von Nukleinsäure, als Homodimer vorliegt (Nowak *et al.* 2014). Um eine mögliche Dimerisierung der RNH von DGLT-A nachzuweisen und damit, neben Tfc4, eine weitere Protein-Interaktionsfläche, wurde die RNH im Hefe-Zwei-Hybrid-System gegen sich selbst getestet.

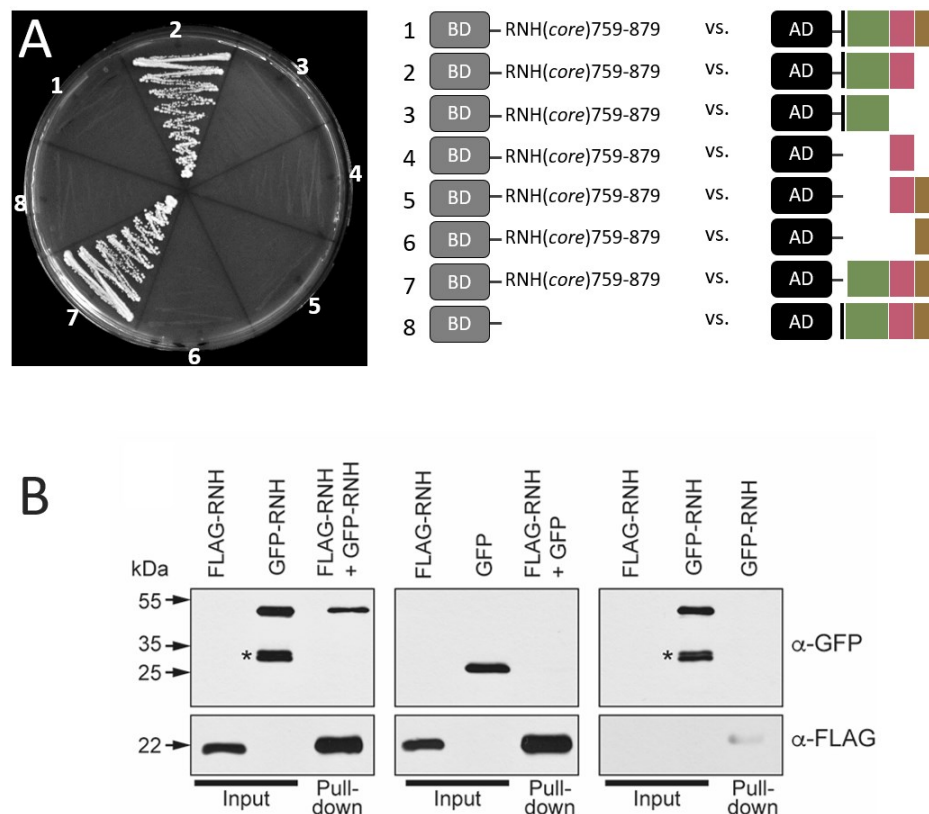


Abbildung 31: Interaktionsanalysen innerhalb der DGLT-A-RNH-Domäne

A: Hefe-Zwei-Hybrid-Untersuchungen zur Interaktion und somit Dimerisierung zwischen der DGLT-A-RNH.

B: *Pulldown*-Nachweis der RNH-RNH-Interaktion. Stern: degradiertes GFP-RNH Protein. GFP-RNH: 46,7 kDa, GFP: 27,7 kDa, FLAG-RNH: 22,0 kDa

Da eine Interaktion zwischen der RNH an AD und BD fusioniert beobachtet wurde, kann davon ausgegangen werden, dass eine Dimerisierung der RNH stattfinden kann (Abbildung 31A, Feld 7). Interessant war der Befund, dass eine Bindung der RNH mit sich selbst offensichtlich nur über den vorderen und zentralen Bereich der RNH stattfand. So interagierten die gekoppelten RNH-Teile 733-800 und 801-846 mit der gesamten RNH (Feld 2), eine Interaktion

mit diesen einzelnen Bereichen war jedoch nicht ersichtlich. Dies lässt vermuten, dass für die RNH-RNH-Bindung die Schnittstelle zwischen diesen beiden Bereichen von Bedeutung ist und somit die zentralen fünf β -Faltblätter eine Rolle bei der RNH-Dimerisierung spielen könnten.

Die RNH-RNH-Bindung konnte *in vitro* durch *Pulldown*-Versuche bestätigt werden (siehe Abbildung 31B). Hier wurde die RNH (733-879) sowohl mit einem FLAG-, als auch mit einem GFP-Tag versehen und heterolog in *E. coli* exprimiert. Die aufgereinigte FLAG-RNH wurde daraufhin an die FLAG-Beads gebunden. Auf die gebundenen Beads wurde der Interaktionspartner GFP-RNH gegeben und inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels Western Blot und Immunfärbung. Abbildung 31B zeigt drei Sets. In Set 1 ist - neben den Inputs - das Signal zu sehen, welches eine Interaktion zwischen den Proteinen bestätigt. Der Nachweis der GFP-RNH durch den Anti-GFP-Antikörper zeigt eine Bande auf der erwarteten Höhe von 46,7 kDa. Set 2 zeigt die erste Negativkontrolle. Hier wurde nur GFP als Interaktionspartner eingesetzt. Set 3 zeigt die zweite Negativkontrolle, in der die Beads nicht mit FLAG-Protein beladen wurden. Eine RNH-RNH-Interaktion und somit eine mögliche Dimerisierung zwischen den beiden Domänen konnte über diese Methode also verifiziert werden.

3.4.2 Interaktionen der DGLT-A-Integrase

3.4.2.1 Interaktionen zwischen Tfc4 und DGLT-A-Integrase

Für die Interaktionsanalysen via Hefe-Zwei-Hybrid-System zwischen Tfc4 und der Integrase von DGLT-A wurde die Integrase in verschiedene Fragmente aufgeteilt und an die GAL4-AD fusioniert. Es wurde gegen Tfc4, welches weiterhin an die GAL4-BD gebunden war, getestet. Untersuchungen der beiden Interaktionspartner mit Tfc4 an AD und Integrase an BD fanden ebenso statt, erbrachten jedoch keine Ergebnisse.

Es wurde beobachtet, dass nur der N-terminale Teil der Integrase (NTD 994-1147) mit Tfc4 interagiert (Abbildung 32A, Feld 4). Diese Interaktion wurde nach weiterer Eingrenzung der Interaktionsfläche auf den erweiterten Teil der N-terminalen Domäne, NED, im Hefe-Zwei-Hybrid-System nicht beobachtet. Anschließend wurde untersucht, ob sich die Interaktionsfläche auf Seiten von Tfc4 (TPR 7-10) eingrenzen lässt. Dafür wurde sowohl das gesamte TPR-Array, als auch vereinzelte TPRs gegen IN-NTD (994-1147) getestet (Abbildung 32B). Es wurde dabei nachgewiesen, dass eine Interaktion auf den TPRs 7/8

stattfindet (Abbildung 32B, Feld 3). Im Gegensatz zu der Interaktion zwischen Tfc4 und RNH (733-879) aus 3.4.1.1 kann man jedoch keine Interaktion der vereinzelt TPRs 7 oder 8 mit IN-NTD sehen. Dies lässt vermuten, dass die Interaktionsfläche mit IN-NTD auf der Schnittstelle der TPRs 7/8 liegt.

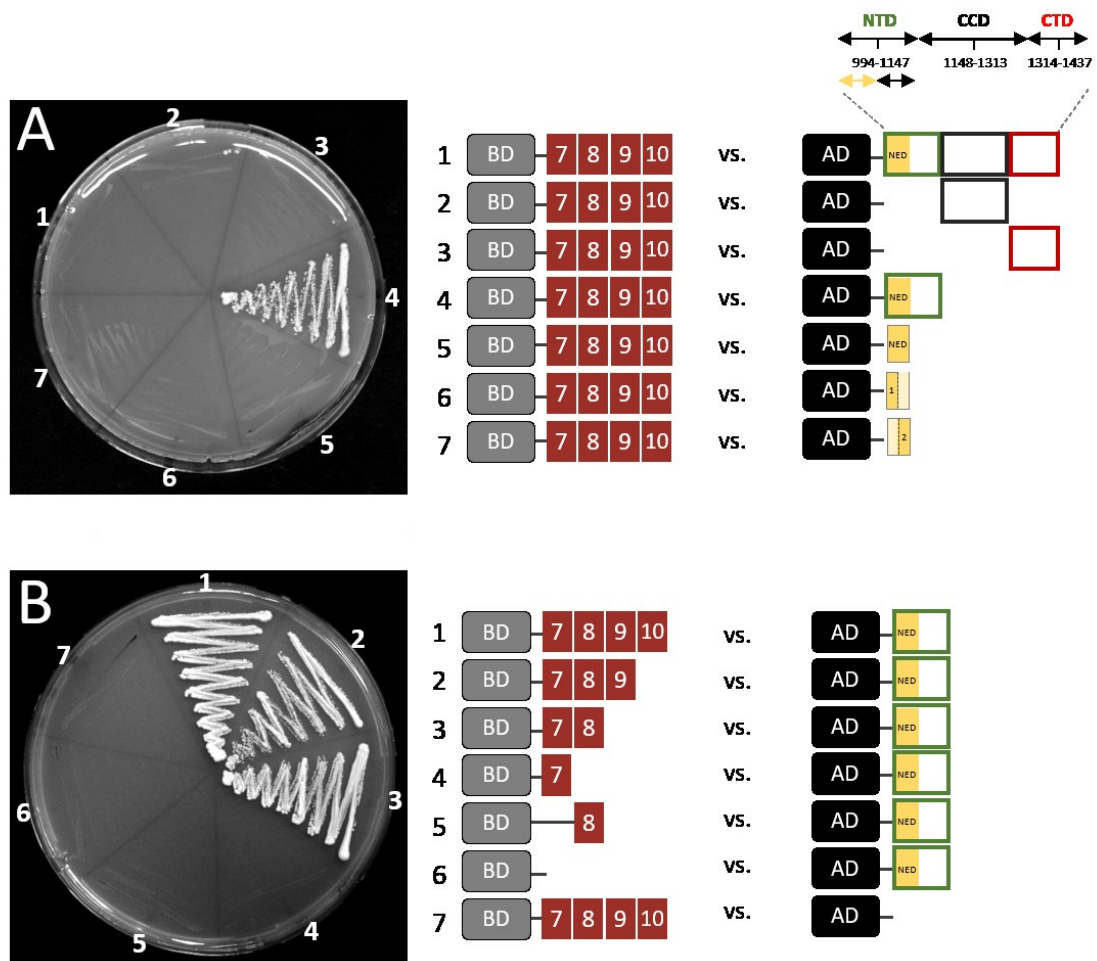


Abbildung 32: Interaktionsanalysen zwischen Tfc4 und DGLT-A-Integrase

A: Untersuchung der Interaktion des rechten Arms von Tfc4 (TPRs 7-10) und verschiedenen Teilen der Integrase von DGLT-A mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System. **B:** Interaktionsanalyse zwischen einzelnen TPRs aus Tfc4 und dem N-terminalen Teil der Integrase (NTD, grün umrandet). NED: N-terminale *extended domain* (gelb hinterlegt innerhalb der NTD), CCD: *catalytic core domain* (schwarz umrandet), CTD: C-terminale Domäne (rot umrandet). Die gelb hinterlegten Felder 1 und 2 innerhalb der NED zeigen eine nochmalige Unterteilung der NED in NED1 und NED2.

Weiterhin konnte die Protein-Protein-Interaktion zwischen Tfc4 (446-608) und der Integrase auch *in vitro* mittels *Pulldown*-Experimenten bestätigt werden. Die Integrase wurde dabei in zwei Teile aufgeteilt. Sowohl der NED-Teil als auch der NTD-Teil wurden jeweils einzeln in

pET33b(+)) kloniert. Da das exprimierte IN-NTD-Protein jedoch unlöslich war, wurden die *Pulldown*-Experimente mit IN-NED durchgeführt, obwohl dieses wie zuvor beschrieben im Hefe-Zwei-Hybrid-System negativ war. Wie bereits beschrieben wurden die Proteine mit einem His₆-Tag, einem 3xFLAG-Tag (DYKDDDDK) oder einem GFP-Tag versehen. Beide Tags wurden jeweils an den N-Terminus der Proteine fusioniert. Der *Pulldown* erfolgte auch hier mittels ANTI-FLAG® M2 Magnetic Beads. Abbildung 33 zeigt, dass eine spezifische Interaktion zwischen FLAG-Tfc4 (22,9 kDa) und GFP-IN-NED (38,2 kDa) nachgewiesen wurde. Zudem wurden die beiden Negativkontrollen wie zuvor beschrieben durchgeführt.

Tfc4 vs. NED

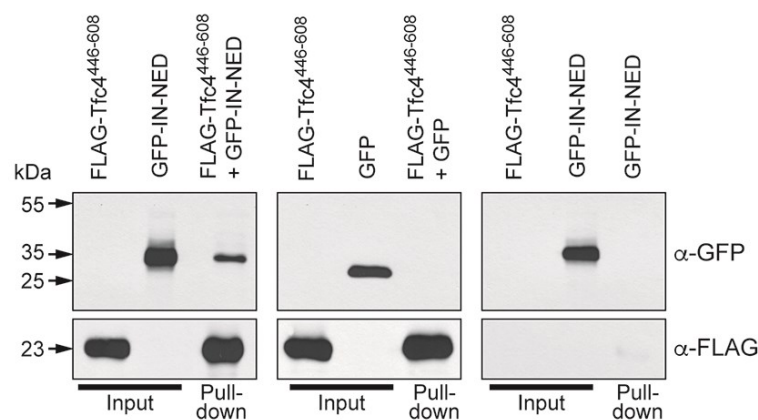


Abbildung 33: *Pulldown*-Experiment zwischen Tfc4 und IN-NED

Nachweis der Interaktion zwischen Tfc4 (446-608) und IN-NED (994-1067) mittels *Pulldown*. Tfc4 war FLAG-markiert und ist 22,9 kDa groß. Es wurde an die *Beads* gebunden und konnte mit einem Anti-FLAG-Antikörper detektiert werden. IN-NED war GFP-markiert und zeigt eine Größe von 38,2 kDa. Es wurde mit einem Anti-GFP-Antikörper nachgewiesen. Das Set zeigt drei Felder. In dem linken Feld ist der *Pulldown* zwischen FLAG-Tfc4 und GFP-IN-NED gezeigt. Die beiden weiteren Felder zeigen Negativkontrollen.

Es lässt sich festhalten, dass das Ergebnis, welches über das Hefe-Zwei-Hybrid-System erlangt wurde, nämlich eine mögliche Interaktion zwischen Tfc4 (446-608) und der Integrase (NTD und NED), auch mittels *Pulldown*-Experimenten verifiziert werden kann. Die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Interaktion von Tfc4 mit der IN-NTD (Hefe-Zwei-Hybrid-System) bzw. IN-NED (*Pulldown*) lassen sich möglicherweise dadurch erklären, dass die Proteine in Hefe- bzw. Bakterienzellen etwas unterschiedlich gefaltet werden.

3.4.2.2 Untersuchungen zur Interaktion zwischen DGLT-A-Integrase und -RNH

Aufgrund der Ergebnisse aus 3.4.1.2, nämlich eine mögliche Interaktion innerhalb der RT-RNH-Domäne von DGLT-A, wurde weiterhin untersucht, ob auch eine Bindung zwischen den Domänen des Polyproteins von DGLT-A auftreten kann. Dafür wurden die Untersuchungen mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System auf die Integrase-Domäne gegen die RT-RNH-Domäne beschränkt und getestet. Abbildung 34 zeigt schematisch die Subdomänen der Integrase, welche sowohl an die GAL4-BD als auch an die GAL4-AD fusioniert wurden und gegen die jeweils an BD und AD gebundene RNH (733-879) getestet wurde. Auf Feld 5 ist ein Wachstum der Hefen und somit eine Interaktion der Proteine IN-NED (994-1067) und RNH (733-879) zu erkennen. Feld 6 repräsentiert eine mögliche Interaktion zwischen IN-NED1 und RNH (733-879). Aus Versuchen dieses Integrase-Teils (IN-NED1) gegen den Leervektor pACT2, welcher kein fusioniertes Protein beinhaltet, war jedoch zu sehen, dass auch hier ein Wachstum der Hefen auftrat. Es wird daher davon ausgegangen, dass IN-NED1 an BD selbstaktivierend war, weshalb diesem Hefewachstum weiterhin keine Aufmerksamkeit geschenkt werden musste. Interessant war jedoch, dass der verlängerte Teil der Integrase (NED) mit der RNH zu interagieren schien. Allerdings nur, wenn IN-NED an BD und RNH an AD fusioniert wurde. Es wurde sich deshalb weiterhin auf die Interaktionspartner IN-NED-BD und RNH-AD konzentriert.

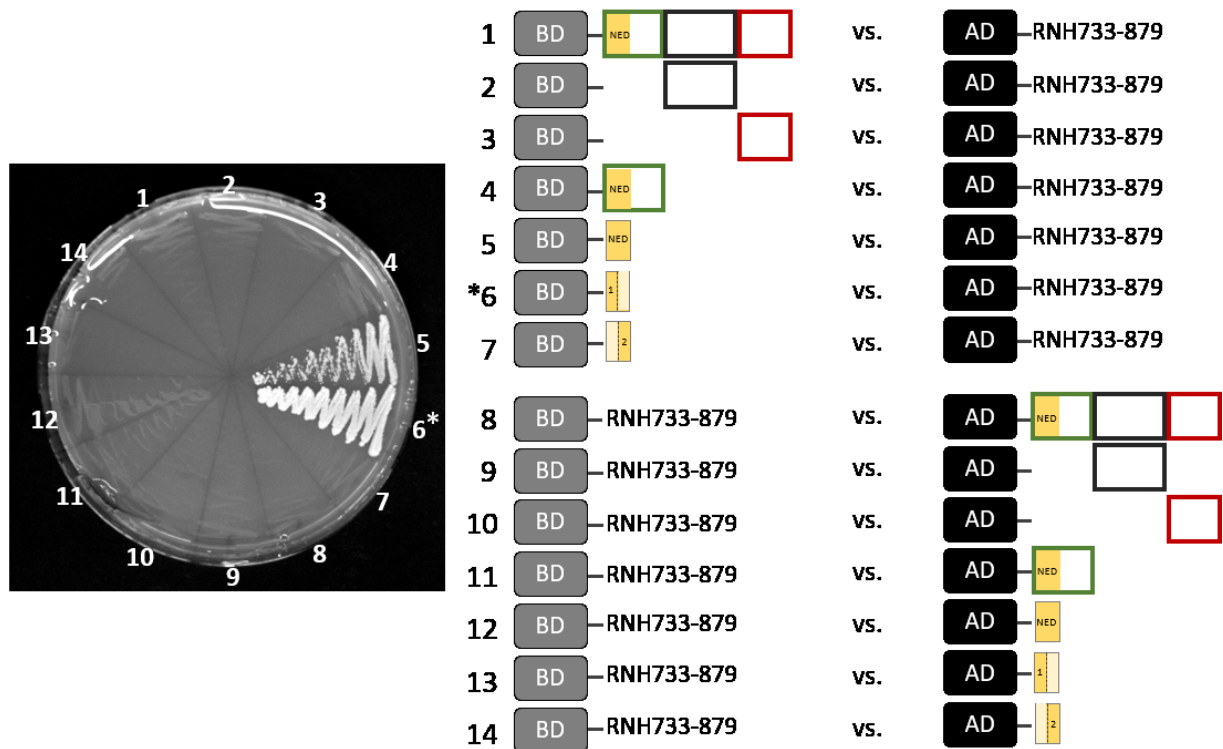


Abbildung 34: Interaktionsanalysen zwischen DGLT-A-IN und RT-RNH-Domänen

Analyse der Interaktion zwischen DGLT-A-Integrase und RNH mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System. Die einzelnen Domänen wurden teilweise in Fragmente aufgeteilt und sowohl an die GAL4-BD als auch -AD fusioniert. Es wurde eine Analyse in beide Richtungen durchgeführt. Felder 1-7 zeigen die Intergrase mit ihren Subdomänen, welche an die BD gebunden wurden und gegen die AD-RNH getestet wurde. Felder 8-14 zeigen die Interaktionsanalyse in umgekehrter Richtung. Stern: IN-NED1 an BD fusioniert ist selbstaktivierend.

Dabei wurde die IN-NED-Domäne gegen unterschiedliche Teile der RT-RNH-Domäne getestet, um die Interaktionsfläche auf Seiten der RNH weiter einzuengen bzw. genauer zu definieren. Abbildung 35A zeigt, dass die Teile, auf der Interaktion ersichtlich war, die identischen Flächen präsentierten, die auch bei der Interaktion zwischen Tfc4 und RNH auftraten. Sowohl der N-terminale Teil der RNH, als auch der C-terminale Teil schien eine Bindung mit der IN-NED-Subdomäne einzugehen (Abbildung 35A, Feld 2 und 5), was weiterhin für eine zweigeteilte Interaktionsfläche der RNH sprechen würde. Zudem wurde zum einen die RNH inklusive der erweiterten „Daumen“-Helix gegen IN-NED getestet (Abbildung 35 Feld 1), zum anderen ohne den Helix-Teil (Feld 7). Beide Ergebnisse zeigten eine Interaktion mit IN-NED, weshalb man auch hier davon ausgehen kann, dass die „Daumen“-Helix (733-758) nicht als erweiterte Interaktionsfläche dient.



A: Hefe-Zwei-Hybrid-Versuche innerhalb der DGLT-A-Domänen IN-NED (994-1067) und verschiedener Fragmenten von RNH. **B:** *Pulldown*-Versuch zwischen heterolog exprimiertem FLAG-RNH- und GFP-IN-NED-Protein. GFP-IN-NED: 38,2 kDa, GFP: 27,7 kDa, FLAG-RNH: 22,0 kDa

85

wurde durchgeführt, um eine Bindung von GFP-IN-NED an die unbeladenen *Beads* auszuschließen. Eine Interaktion zwischen dem erweiterten Teil der N-terminalen Domäne der Integrase und der RT-RNH-Domäne gilt somit als wahrscheinlich.

3.4.2.3 Untersuchungen zur Interaktion innerhalb der DGLT-A-Integrase-Domäne

Aus Strukturanalysen der Integrase Domäne von Retroviren ist bekannt, dass es, während des Vorgangs der Integration in das Genom, zur Bildung von Dimeren, im aktiven Zustand sogar zu Multimeren, kommen kann (Wang *et al.* 2001). Im Folgenden wurde daher untersucht, ob die Integrase-Domäne von DGLT-A ebenso zur Interaktion mit sich selbst neigt. Dafür wurde die DGLT-A-Integrase in verschiedene Abschnitte unterteilt und diese an die BD oder AD der Hefevektoren fusioniert, um mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System testen zu können.

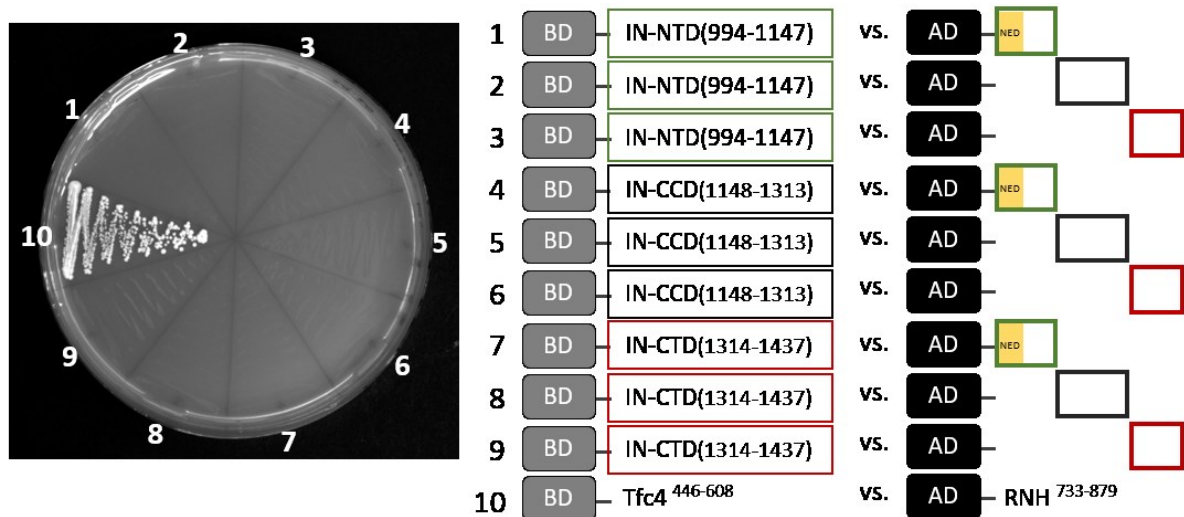


Abbildung 36: Interaktionsanalysen innerhalb der Integrase-Domäne von DGLT-A

Die drei Subdomänen der Integrase wurden sowohl an BD als auch AD der Hefevektoren fusioniert und mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System gegeneinander getestet. Feld 10: Positivkontrolle, grüner Kasten: IN-NTD, schwarzer Kasten: IN-CCD, roter Kasten: IN-CTD

Es wurde deutlich, dass die drei Subdomänen weder mit sich selbst, noch mit den jeweils anderen Domänen eine Bindung eingehen bzw. Interaktion zeigen (Abbildung 36). Als Positivkontrolle diente die robuste Interaktion zwischen Tfc4 (446-608) und RNH (733-879). Da jedoch aus den vorherigen Interaktionsanalysen mit der DGLT-A-Integrase gesehen wurde, dass vor allem die N-terminale *extension domain* (NED) eine mögliche Interaktionsfläche bietet, wurde zudem noch eine Analyse durchgeführt, bei der hauptsächlich dieser Bereich der Integrase genauer untersucht wurde.

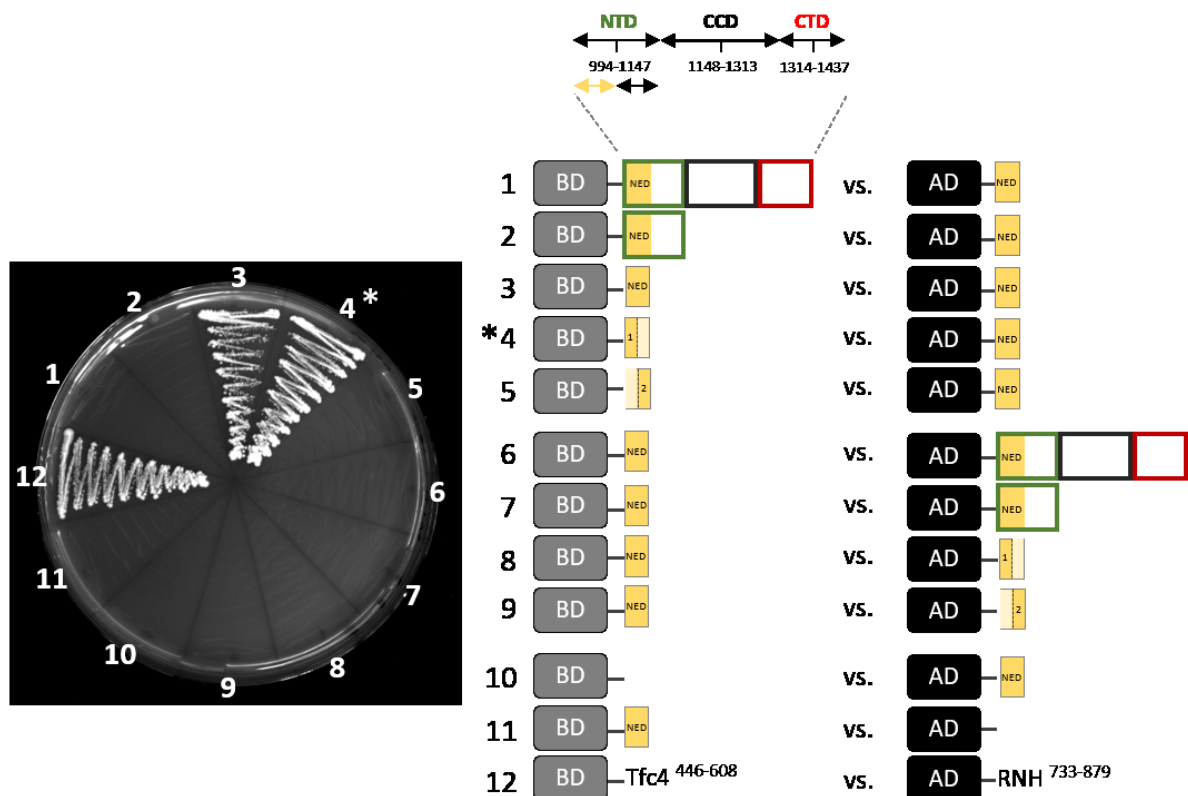


Abbildung 37: Interaktionsanalyse zwischen DGLT-A-Integrase und der erweiterten N-terminalen Domäne IN-NED

Untersuchung der Interaktion zwischen der erweiterten N-terminalen Domäne, NED, und verschiedenen Fragmenten der Integrase-Domäne von DGLT-A. Die Untersuchungen erfolgten in beide Richtungen. Feld 10: Tfc4 (446-608) vs. RNH (733-879) dient als Positivkontrolle. Sternchen: IN-NED1-Fragment an BD fusioniert ist selbstaktivierend.

Feld 3 in Abbildung 37 repräsentiert die Interaktion der IN-NED-(994-1067)-Domäne mit sich selbst, was eine Dimerisierung der DGLT-A-Integrase über den vordersten N-terminalen Teil vermuten lässt. Die Interaktion zwischen IN-NED1 und IN-NED (Feld 3) wurde weiterhin nicht beachtet, da aus Vorversuchen bekannt wurde, dass IN-NED1 an BD fusioniert

selbstaktivierend ist. Um dies für IN-NED ausschließen zu können, wurde in beide Richtungen jeweils gegen die Leervektoren getestet (Feld 10 und 11). Als Positivkontrolle diente Tfc4 (446-608) gegen RNH (733-879). Es lässt sich zusammenfassen, dass speziell der N-terminale Teil der Integrase-Domäne von DGLT-A Interaktionen mit anderen Proteinen eingeht. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen über die Interaktionspartner von Ty3. Auch hier spielt vor allem der erweiterte N-terminale Teil der Integrase (NED) bei der spezifischen Integration eine Rolle (Aye *et al.* 2001).

3.4.3 Untersuchung der Interaktionsflächen der RT-RNH-Domäne von DGLT-A

Aus den aufgeführten Ergebnissen konnte bisher erkannt werden, dass drei Proteine an der spezifischen Integration von DGLT-A in das Genom von *D. discoideum* beteiligt sind, die TFIIC-Untereinheit Tfc4, der N-terminale Bereich der Integrase-Domäne und die RNH von DGLT-A. Dabei wurde festgestellt, dass die RNH neben der Bildung von Homodimere noch zusätzlich eine Interaktionsfläche für Tfc4 und die Integrase (IN-NED) bietet. In den oben aufgeführten Ergebnissen ist zu sehen, dass die Interaktion zwischen RNH-RNH in den Aminosäurebereichen 733-846 stattfindet. Da es sich dabei um den Bereich der fünf β -Faltblätter handelt, wurde vermutet, dass die Interaktionsfläche für eine Homodimerisierung der RNH auf diesem zentralen Bereich liegt. Weiterhin konnte angenommen werden, dass die Interaktion zwischen RNH und Tfc4, sowie RNH und IN-NED auf anderen Flächen des RNH-Proteins stattfinden könnte. Beim Vergleich der Bindung der einzelnen RNH-Teile mit Tfc4 und IN-NED fiel allerdings auf, dass die gleichen Flächen miteinander interagieren. Daher wurde davon ausgegangen, dass die RNH Interaktionen mit Tfc4 und IN-NED über ihre α -Helices und ihre Loop-Strukturen eingehen könnte. Um diese Hypothesen zu überprüfen, wurde eine RNH-Mutante im Hefe-Zwei-Hybrid-System gegen die drei in Frage kommenden Interaktionspartner getestet. In der RNH-Mutante wurden drei geladene Aminosäuren (Glutaminsäure und Lysin), welche auf der Oberfläche der zentralen fünf β -Faltblätter liegen, gegen Alanin ausgetauscht. Der Aminosäureaustausch erfolgte an den RNH-Positionen 771(E->A), 831(K->A) und 864(E->A) (siehe Abbildung 38A).

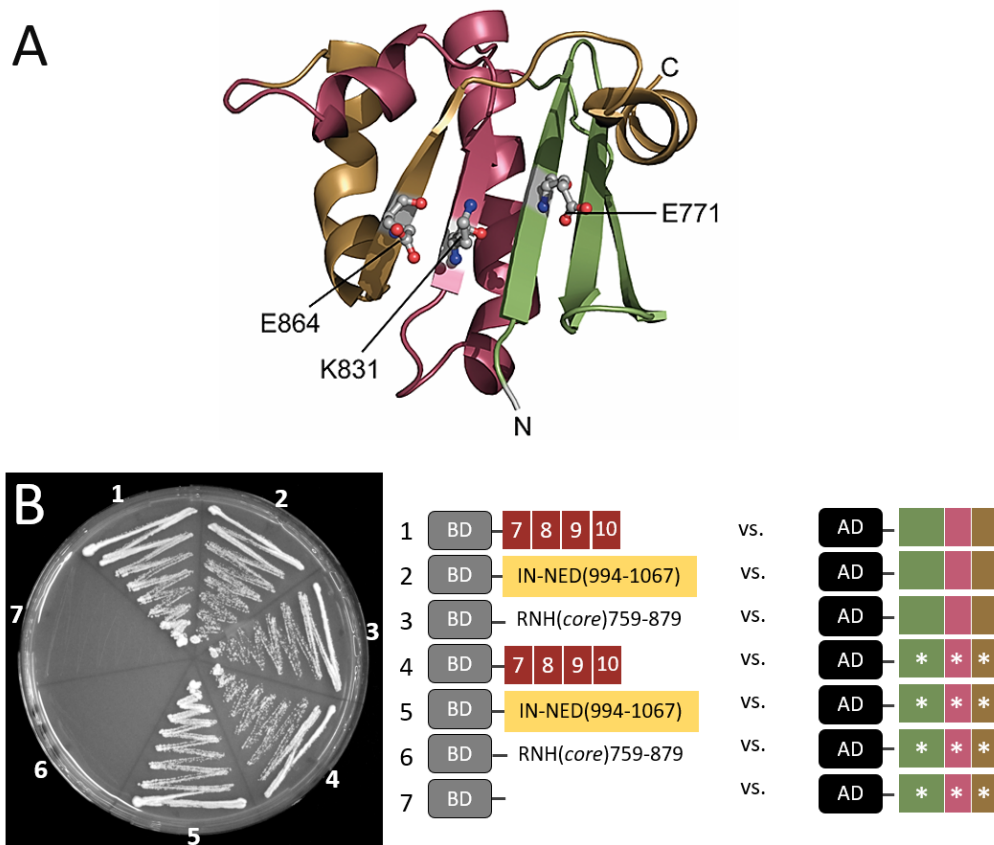


Abbildung 38: Analyse der Interaktionsflächen der RNH-Domäne von DGLT-A

A: Struktur der RNH-Domäne aus DGLT-A. Das Modell basiert auf der veröffentlichten RT-RNH-Kristallstruktur von Ty3 (PDB ID: 4OL8). Die Mutationen E771A, K831A und E864 liegen auf den zentralen β -Faltblättern und sind als Kugel-Stab-Modell kenntlich gemacht. **B:** Interaktionsanalyse via Hefe-Zwei-Hybrid-System zwischen der Wildtyp-RNH(core) gegen ihre Interaktionspartner und der dreifach RNH-Mutante. Die Mutationen sind als weiße Sterne in der Abbildung kenntlich gemacht.

Die Interaktionsanalysen mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems bestätigten die aufgestellte Hypothese. Eine Interaktion zwischen der Wildtyp-RNH-Domäne und ihren drei genannten Partnern war, wie vorherige Ergebnisse zeigten, gegeben (Abbildung 38 Felder 1, 2, 3). Bei der Interaktion zwischen der RNH-Mutante mit Tfc4 und IN-NED war ebenfalls ein Wachstum der Hefen und somit eine Interaktion zwischen den Proteinen zu sehen (Felder 4 und 5). Einzig die Interaktion zwischen der Wildtyp-RNH und der RNH-Mutante wurde unterbunden (Feld 6). Daraus kann man schließen, dass die RNH-RNH-Bindung wie vermutet über die β -Faltblätter stattfindet, wohingegen die Interaktionsflächen mit Tfc4 und IN-NED an anderer Stelle zu suchen sind.

3.4.4 Untersuchung der Interaktionsflächen auf der TFIIIC-Untereinheit Tfc4 TPRs 7-10

In vorherigen Versuchen wurde festgestellt, dass die Untereinheit des TFIIIC, Tfc4, sowohl als Bindungspartner für die RNH-, als auch für die Intergrase-Domäne von DGLT-A zur Verfügung steht. Hieran ist vor allem der „rechte Arm“ des Tfc4-Proteins mit den TPRs 7-10 als Interaktionsfläche beteiligt. Durch weitere Interaktionsanalysen wurde festgestellt, dass sich die RNH und die IN-NTD die Flächen der Tfc4 TPRs 7 und 8 teilen, welche demnach eine hohe Bindungsaffinität aufweisen. Aus Untersuchungen in *S. cerevisiae* wurde nachgewiesen, dass das TPR-Array 1-10 von Tfc4 generell eine wichtige Rolle bei der Organisation des Präinitiationskomplexes für die POLIII spielt. So konnte mittels der Mutation eines DL-Motivs in TPR 8 festgestellt werden, dass es zu einer reduzierten Bindung der Proteine Brf1 und Bdp1 kommt und dass keine Interaktion mehr zwischen Tfc4 und Tfc3 stattfindet (Male *et al.* 2015). Interessanterweise sind die Aminosäuren, welche mutiert wurden, im Tfc4 von *D. discoideum* konserviert. Dieses konservierte Aminosäuremotiv DL befindet sich in der Helix A des TPR 8 an Position D486/L487. Zudem wurde festgestellt, dass auch das TPR 7 solch ein Motiv in der Helix A besitzt. Hier findet man Asparaginsäure (D) auf Position 447 und Leucin (L) auf Position 448 (siehe Abbildung 39).

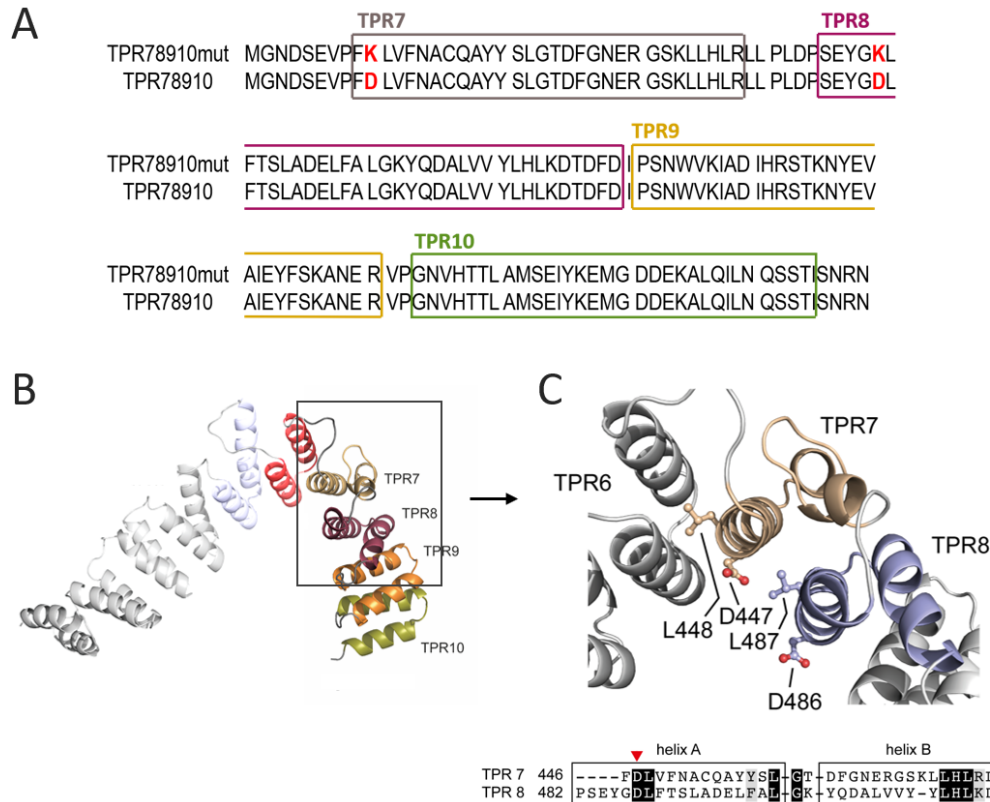


Abbildung 39: Tfc4 (TPRs 7-10) von *D. discoideum* mit aufgezeigten Mutationen

Figure 1: Schematic representation of the experimental design. The left panel shows a petri dish with six sectors labeled 1 to 6. Sectors 1 and 2 show bacterial growth streaks. The middle panel is a table showing the bacterial strains (BD or AD) and the number of replicates (7, 8, 9, 10) for each sector. The right panel shows the comparison of AD strains (AD) with IN-NTD(994-1147) for sectors 1, 2, 3, and 4.

| Sector | Strain | 7 | 8 | 9 | 10 |
|--------|--------|---|---|---|----|
| 1 | BD | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 2 | BD | * | * | 9 | 10 |
| 3 | BD | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 4 | BD | * | * | 9 | 10 |
| 5 | BD | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 6 | BD | * | * | 9 | 10 |

Comparison of AD strains (AD) with IN-NTD(994-1147) for sectors 1, 2, 3, and 4.

| Sector | AD | IN-NTD(994-1147) |
|--------|----|------------------|
| 1 | AD | IN-NTD(994-1147) |
| 2 | AD | IN-NTD(994-1147) |
| 3 | AD | IN-NTD(994-1147) |
| 4 | AD | IN-NTD(994-1147) |

Hefe-Zwei-Hybrid-Experiment zur Analyse der Bindung zwischen Wildtyp- und mutierten TPRS7-10 aus Tfc4 und RNH bzw. IN-NTD von DGLT-A. Die Mutationen in TPR 7 und TPR 8 sind als weißer Stern markiert.

In den Versuchen wurde festgestellt, dass weder die RNH, noch die IN-NTD an das TPR-Array mit den mutierten TPRs 7 und 8 (Abbildung 40 Felder 2 und 4) bindet. Dies bestätigt zum einen nochmals, dass eine Interaktion beider Proteine aus DGLT-A auf die TPRs 7 und 8 reduziert werden kann, zum anderen aber auch, dass weiterhin keine genaue Definition der Interaktionsfläche zwischen Tfc4 RNH und Tfc4 IN-NTD möglich ist. Die Ergebnisse dieses Experiments müssen jedoch als vorläufig angesehen werden, da es bisher nicht gelungen ist eine korrekte Expression des mutierten BD-TPR7/8-Fusionsproteins im Hefe-Zwei-Hybrid-System durch Interaktion mit anderen Partnern nachzuweisen. Auch eine Überprüfung der Expression dieser Proteine mittels Western Blot ergab kein auswertbares Ergebnis.

3.5 Mobilisierung von genetisch markierten Retrotransposons

Um überprüfen zu können, ob die identifizierten Proteininteraktionen zwischen der TFIIC Untereinheit Tfc4 und den DGLT-A-Domänen RNH und Integrase (IN-NTD) tatsächlich für die Identifizierung von Integrationszielen verwendet werden, ist es notwendig einen *In vivo*-Retrotranspositionstest zu entwickeln. Dieser wurde basierend auf den vorhandenen Erfahrungen mit TRE5-A (Siol *et al.* 2011) erweitert.

Bei dem TRE5-A-Element handelt es sich um ein Non-LTR-Retrotransposon aus *D. discoideum*. Ein vollständiges, autonomes TRE5-A.1-Element ist 5657 bp groß und codiert für zwei ORFs, welche in unterschiedlichen, sich ca. 70 bp überlappenden, Leserahmen angeordnet sind (Marschalek *et al.* 1992b). Charakteristisches Merkmal ist der modulare Aufbau der flankierenden untranslatierten Regionen. Anders als bei LTR-Retrotransposons beginnt das Element mit einem A-Modul, welches eine interne RNA-Polymerase-II-Promotoraktivität besitzt, gefolgt von einem B-Modul, in dem sich der Translationsstart des ORF1-Proteins befindet und welches sich am Ende des zweiten ORFs wiederholt. Das 3'-Ende des Elements wird durch das A/T-reiche C-Modul terminiert (Marschalek *et al.* 1992b, Schumann *et al.* 1994) (siehe Abbildung 41). Innerhalb der Gruppe der TRE5-Elemente gibt es auch nicht-autonome Elemente. So ist der komplette zweite ORF des TRE5-A.2-Retrotransposons deletiert, zusätzlich befindet sich zwischen B- und C-Modul eine charakteristische Deletion (Marschalek *et al.* 1992a). Trotzdem sind diese Elemente aktiv. Sie können erfolgreich durch die ORF2-Proteine von TRE5-A.1 *in trans* mobilisiert werden (Beck *et al.* 2002, Siol *et al.* 2006).

Basierend auf dieser Beobachtung konnte ein nicht-autonomes, artifizielles TRE5-A-Element erzeugt werden, welches trotz seiner minimalen Form in Zellkulturen aktiv ist (Siol *et al.* 2011). Das Element besteht aus einem Aktin-6-Promotor, der für die Transkription des gesamten Elements verantwortlich ist und dem ORF1-Gen aus TRE5-A.1. Kernstück des artifiziiellen Elements ist eine Resistenzkassette, die als *mbsrl* bezeichnet wird. Diese besteht aus einem Blasticidin-S-Deaminase-Gen (*bsr*), in das ein Intron in reverser Orientierung einkloniert wurde (*bsrl*). Das *bsrl*-Gen wird von einem konstitutiven Promotor (A15P) kontrolliert und wurde in inverser Orientierung in das minimale TRE5-A kloniert, sodass in dem artifiziiellen TRE5-A^{bsr} Retrotransposon das *bsrl*-Gen in Minusstrang-Richtung exprimiert wird (*mbsrl*), das Intron jedoch in der Plusstrang-Richtung bezüglich der Expression der TRE5-A^{bsr}-RNA vorliegt und aus dieser herausgespleißt werden kann (siehe Abbildung 41).

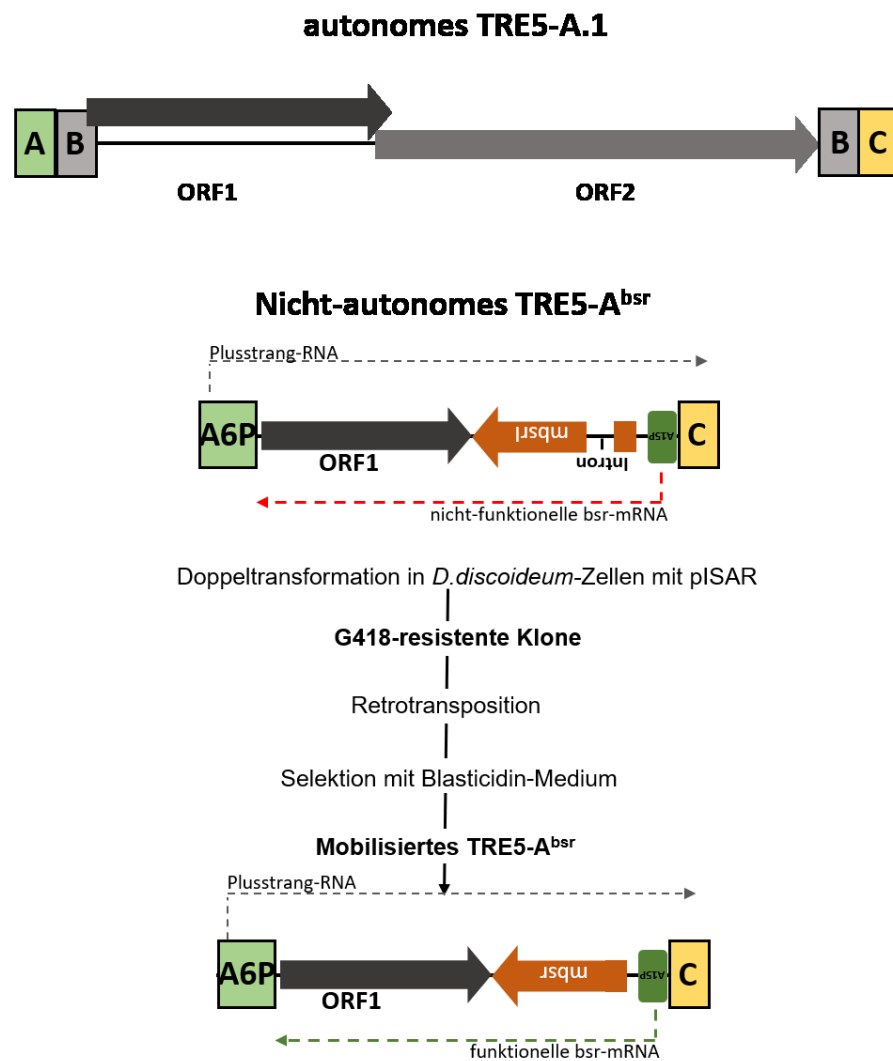


Abbildung 41: TRE5-A-Retrotranspositionstest nach Siol *et al.* 2011

Oben: Schematische Darstellung des autonomen TRE5-A.1-Retrotransposons aus *D. discoideum*. Darunter ist das nicht-autonome, artifizielle TRE5-A^{bsr}-Element dargestellt, welches für den Retrotranspositionstest verwendet wurde. A6P: Aktin-6-Promotor, ORF: offener Leserahmen, *mbsr*: Blasticidin-Gen inkl. Intron, welches in Minusstrang-Richtung exprimiert wird, A15P: Aktin-15-Promotor, C: C-Modul von TRE5-A, pISAR: Plasmid mit G418-Resistenz.

Die Blasticidin-Resistenzkassette, welche den Aktin15-Promotor (A15P) und das Blasticidin-Gen (*bsr*) beinhaltet, wurde aus dem Plasmid pBSR1 (Shaulsky *et al.* 1996) via PCR isoliert. Da das *bsr*-Gen eine einzige BglII-Schnittstelle besaß, wurde diese genutzt um ein Intron dort zu integrieren. Dieses Intron wurde aus dem S17-Gen aus *D. discoideum*, welches für ein ribosomales Protein kodiert, übernommen (Bäuerle und Mutzel 1994). Es ist 74 bp lang und besitzt typische Intron Grenzen (*splice donor* (SD) und *splice acceptor* (SA) sites), welche entgegen der Transkriptionsrichtung des *bsr*-Gens zu finden sind (siehe Abbildung 42).

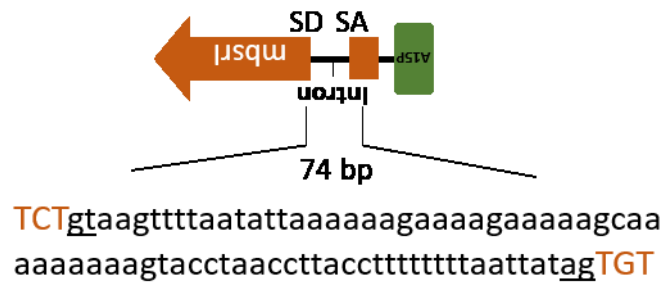


Abbildung 42: Darstellung der invertierten Blastocidin-Resistenzkassette inklusive Intron

Die Blastocidin-Resistenzkassette besteht aus einem Aktin15-Promotor (A15P, grün) und dem Blastocidin-Gen (*mbsr*, orange). Das integrierte Intron besitzt Intronengrenzen. SD: *splice donor site*, SA: *splice acceptor site*. Unten sind die 74 bp des Introns aufgezeigt mit unterstrichenen SD und AD. Die orange-farbenen, großen Basenpaare gehören jeweils zum *bsr*-Gen. *mbsr*: Blastocidin-S-Deaminase-Gen inkl. Intron, Expression erfolgt in Minusstrang-Richtung

Um sicher zu gehen, dass ein authentisches, funktionelles Blastocidin-Gen nach dem Spleißen entsteht, wurde nach der Integration des Introns die BglII-Schnittstelle am 3'-Ende des Gens durch zielgerichtete Mutagenese entfernt (Siol *et al.* 2011).

Bei der Durchführung des Retrotranspositionstests wurde das artifizielle TRE5-A-Element gemeinsam mit pISAR in die *D. discoideum*-Zellen transformiert. Durch das Intron innerhalb des *mbsr*-Gens konnte dieses vorerst nicht funktionell exprimiert werden und die Zellen keine Blastocidin-Resistenz entwickeln. Bei einer Retrotransposition des artifiziellen Elements jedoch findet nach der Transkription ein Spleiß-Vorgang statt, der das Intron im *mbsr*-Gen entfernt (*mbsr*) und dieses damit funktionell macht. Somit kann, nach der Integration des genetisch markierten, artifiziellen Retrotransposons in das Genom, auf Retrotranspositionereignisse selektioniert werden, da die betroffenen Zellen eine Blastocidin-Resistenz erwerben (Abbildung 41). Diese Zellen können klonal oder als Pool von Klonen isoliert werden, um mögliche positionsspezifische Sprungereignisse analysieren zu können.

Ziel in diesem Bereich der Arbeit war es nun, ein nach dem TRE5-A^{bsr}-Vorbild konstruiertes, genetisch markiertes DGLT-A zu generieren, um eine spezifische Integration vor tRNA-Gene *in vivo* nachweisen zu können.

3.5.1 Das genetisch markierte DGLT-A-Retrotransposon

Innerhalb des Genoms von *D. discoideum* wurden bisher neben den Solo-LTRs nur DGLT-A Retrotransposons gefunden, welche unvollständig sind bzw. nicht dem bioinformatisch erstellten Konsensus entsprechen (Glöckner *et al.* 2001, Winckler *et al.* 2005). Die Tatsache, dass scheinbar keine komplette Kopie dieses Elements im Genom von *D. discoideum* existiert, erschwerten somit die Klonierungsarbeiten.

Für die Klonierung des genetisch markierten DGLT-A Elements wurde deshalb dessen ORF vorerst in zwei Fragmente geteilt (siehe Abbildung 43). Für Fragment 1 wurden die Primer DGLT-Absr_neu-01/ DGLT-Absr_neu-02 und für Fragment 2 die Primer DGLT-Absr_neu-03/ DGLT-Absr_neu-04 benutzt. Die PCRs für beide DGLT-A Fragmente wurde an genomischer DNA von AX2 gemacht. Beide Fragmente wurden vorerst in pGEM-T subkloniert, bevor Fragment 1 mit Fragment 2 in pGEM-T fusioniert wurde. Zudem wurde eine PCR an genomischer DNA von AX2 mit den Primern DGLT-Absr_neu-05/ DGLT-Absr_neu-06 durchgeführt und somit das 5'-LTR-Ende von DGLT-A in pGEM-T ligiert. Das 5'-Ende von DGLT-A wurde daraufhin in den pGEM-T Vektor kloniert, in dem schon der fusionierte DGLT-A-ORF existierte. Zuletzt musste der fertige DGLT-A-ORF mit der Blasticidin-Kassette und dem 3'-LTR fusioniert werden. Dafür wurde mittels den Restriktionsenzymen AgeI und NotI diese Einheiten aus dem Plasmid H3R-bsrI-H3R geschnitten. Das Plasmid H3R-bsrI-H3R wurde in vorherigen Arbeiten erstellt. Dabei handelt es sich um das kleinstmögliche, artifizielle DGLT-A Retrotransposon (Schiefner 2014). Dieses nicht-autonome Element besteht lediglich aus dem 5'-LTR, dem Blasticidin-Resistenzmarker inklusive des Actin-15-Promotors und dem 3'-LTR. Die Bezeichnung „H3R“ (*Hind3-repeats*) bezieht sich auf die frühere Nomenklatur der Solo-LTRs im Genom von *D. discoideum*, welche als eigene repetitive Elemente identifiziert und definiert wurden (Hofmann *et al.* 1991). Durch die Fusion des DGLT-A-ORF mit dem Blasticidin-Resistenzmarker und dem 3'-LTR entstand letztendlich das fertige, genetisch markierte DGLT-A-Retrotransposon DGLT-A^{bsr} (Plasmidname: pGEMT-T-DGLTA_bsr_neu). Bevor jedoch DGLT-A^{bsr} für die Durchführung des Retrotranspositionstests eingesetzt wurde, wurde durch eine komplette Sequenzierung sichergestellt, dass das artifizielle DGLT-A der zu erwartenden Konsensussequenz entsprach.

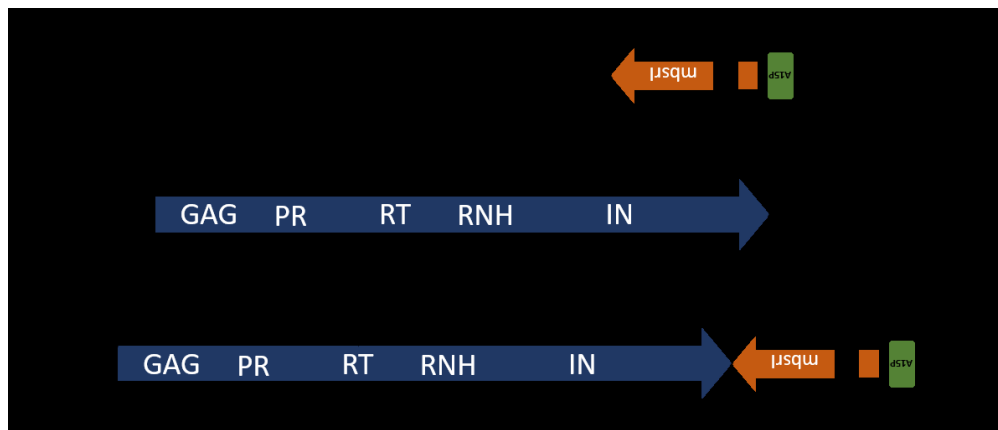


Abbildung 43: Klonierungsstrategie für das genetisch markierte Retrotransposon DGLT-A

Die DGLT-A-Fragmente wurden direkt an genomischer DNA von AX2-Zellen amplifiziert. Die invertierte Blasticidin-Resistenzkassette wurde aus dem H3R-bsrI-H3R-Plasmid ausgeschnitten und mit den fusionierten DGLT-A-Fragmenten 1 und 2 ligiert. Aufgezeigt sind zudem die während der Klonierung eingebrachten Restriktionsschnittstellen.

Das DGLT-A^{bsr}-Plasmid wurde daraufhin in *D. discoideum* transformiert. Gleichzeitig wurde in die Zellen pISAR eingebracht (Maniak und Nellen 1989). Dieses Plasmid vermittelt G418-Resistenz und lässt dadurch eine Selektion und Isolation der transformierten Zellen zu, die beide Plasmide erfolgreich und stabil in das Genom integriert haben. Es wurde getestet, ob eine Retrotransposition von DGLT-A^{bsr} im AX2-Stamm stattfindet. Nach der Blasticidin-Selektion konnten jedoch keinerlei Klone beobachtet werden und eine Analyse der Retrotransposition war nicht möglich. Eine mögliche Erklärung war, dass die Ursache dafür zelluläre Abwehrmechanismen, in Form einer RNA-Interferenz (RNAi) war, da beobachtet wurde, dass das mit DGLT-A verwandte und parallel klonierte Retrotransposon Skipper-1^{bsr} nur in RNAi-Mutanten aktiv ist (siehe Abschnitt 3.5.2.1). Der Retrotranspositionstest wurde danach mit DGLT-A^{bsr} in einer RNAi-Mutante wiederholt. Dieser Stamm wurde von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Christian Hammann von der Jacobs University in Bremen generiert. Hierbei handelt es sich um einen *Knockout* der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (Rrp: *RNA-dependent RNA-polymerase*) RrpC (Wiegand *et al.* 2013). Nach Transformation von DGLT-A^{bsr} in RrpC⁻-Zellen und Selektion auf Blasticidin-Resistenz wurden Klone erhalten, welche darauf hindeuteten, dass DGLT-A^{bsr} retrotranspositionskompetent ist.

Die Durchführung des DGLT-A^{bsr}-Retrotranspositionstests, basierend auf dem Protokoll von Siol *et al.* 2011 für TRE5-A^{bsr}, ist unter 2.2.2.8 genauer beschrieben. Abbildung 41 beschreibt zudem noch einmal die Hauptpunkte schematisch. Um zu beweisen, dass es zu einer

Mobilisierung des artifiziellen DGLT-A^{bsr}-Elements kam, wurde eine PCR an genomischer DNA der Blastocidin-Klone durchgeführt. Hierfür wurden die Primer *bsr-19*/*bsr-test-02* verwendet. Die Primer binden dabei rechts und links des Introns im *mbsrI*-Gen. Im Falle einer Retrotransposition des DGLT-A^{bsr} sollte das PCR-Produkt mit der gleichen Primerkombination demnach kleiner sein als zuvor, da das Intron herausgespleißt wird und somit ein Größenunterschied von 74 bp entsteht (siehe Abbildung 44B).

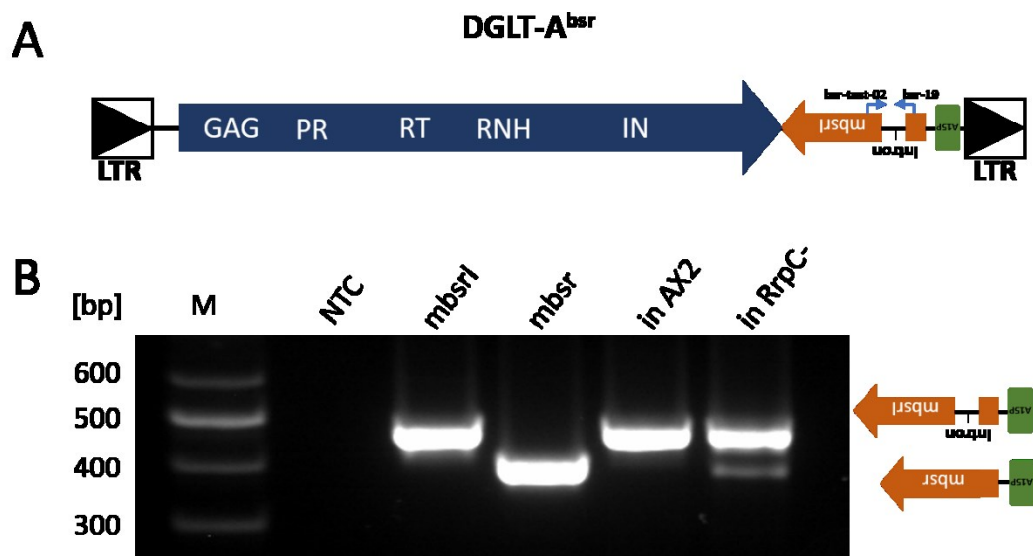


Abbildung 44: Nachweis der Mobilisierung des genetisch markierten DGLT-A^{bsr}

A: Schematische Abbildung des neuen, genetisch markierten DGLT-A-Elements, wie es im Retrotranspositionstest verwendet wurde. Pfeile im Blastocidin-Resistenzgen zeigen die Bindestelle der Primer *bsr-test-02* und *bsr-19* auf. **B:** Nachweis, dass DGLT-A^{bsr} im Genom von *D. discoideum* mobilisiert wurde. Amplifizierter Bereich mit Intron: 466 bp, ohne Intron 392 bp. NTC: *no template control*, *mbsrI*: *bsr*-Gen inkl. Intron, *mbsr*: *bsr*-Gen ohne Intron, in AX2: DGLT-A^{bsr} in Stamm AX2 transformiert, in RrpC-: DGLT-A^{bsr} in Stamm RrpC- transformiert.

Wird demnach eine PCR, mit den oben genannten Primern, an der genomischen DNA von *D. discoideum* durchgeführt, erhält man ein Produkt, welches bei aktiven, genetisch markierten Elementen eine Doppelbande im Gel zeigt. Die obere Bande entspricht dabei den nicht-mobilisierten, genomischen Kopien in *D. discoideum*, welche das Intron noch besitzen (446 bp), den sogenannten „Masterelementen“. In transponierten Elementen hingegen wurde das Intron herausgespleißt und es resultiert daraus eine kleinere Bande (392 bp) (Abbildung 44B, letzte Spur). Um einen endgültigen Beweis zu erhalten, dass es sich bei diesem Element um das genetisch markierte DGLT-A handelt, wurde eine erneute PCR an der

genomischen DNA der Blasticidin-Klone aus *D. discoideum* durchgeführt. Dabei wurde eine Primerkombination gewählt, die über das Intron hinaus zusätzlich im hinteren Bereich von DGLT-A^{bsr} bindet. Es wurde wieder ein Produkt amplifiziert, welches die typische Doppelbande zeigte. Die untere der beiden Banden wurde daraufhin aus dem Agarosegel ausgeschnitten und kloniert. Durch die anschließende Sequenzierung dieses Produkts (siehe Abbildung 45) konnte ein Teil des ORFs von DGLT-A (hinterer Teil des Fragment 2, blau umrandet), die eingebaute Agel-Schnittstelle (gelb) und ein Teil des *mbsr*-Gens (orange) identifiziert werden. Es wurde deutlich, dass nach der Mobilisierung des Elements das Intron herausgespleißt wurde (orange-schwarz-farbige Pfeile). Somit konnte der endgültige Beweis dafür geliefert werden, dass das neue artifizielle DGLT-A^{bsr} im Genom von *D. discoideum* transponiert und demnach als aktiv angesehen werden kann (siehe Abbildung 45).

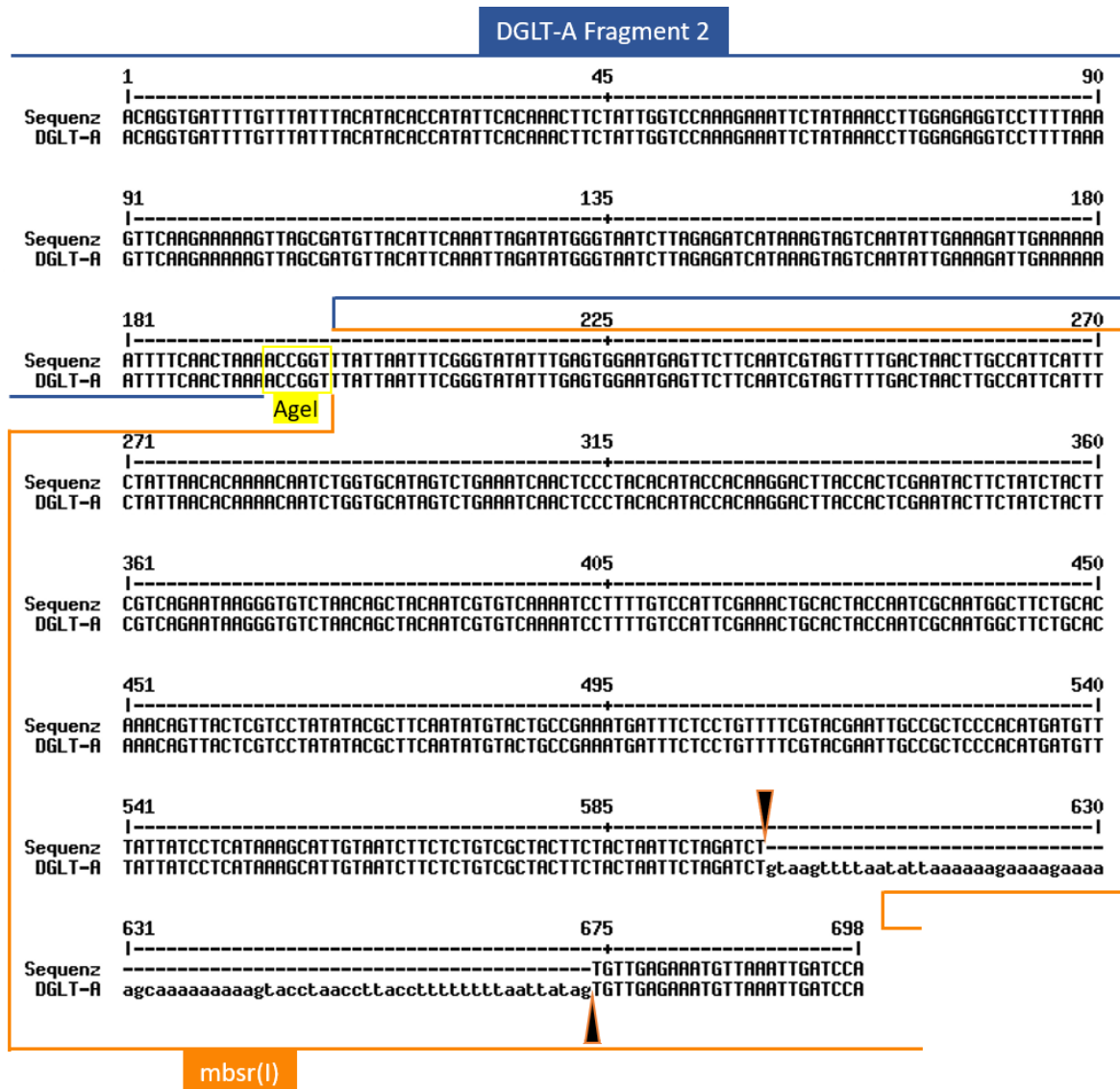


Abbildung 45: Nachweis der Retrotransposition von DGLT-A^{bsr}

Alignment zwischen dem genetisch markierten DGLT-A^{bsr} mit Intron (DGLT-A) und der amplifizierten und subklonierten Sequenz aus dem Genom von *D. discoideum* (Sequenz) nach der Durchführung des Retrotranspositionstests. Blau umrandet: hinterer Teil von DGLT-A (Fragment 2), gelb: Agel-Schnittstelle, orange umrandet: Teil der Blasticidin-Resistenzkassette, schwarz-orange-farbige Pfeile: markieren den Bereich des Introns, welches aus dem mobilisierten DGLT-A („Sequenz“) herausgespleißt wurde.

3.5.1.1 Effizienz des Spleißens des *mbsrI*-Gens in DGLT-A^{bsr}

Bei der Durchführung des Retrotranspositionstests mit DGLT-A^{bsr} fiel auf, dass nur wenige Retrotranspositionseignisse auftraten und somit kaum Blasticidin-resistente Klone für weitere Analysen der Integrationsspezifität von DGLT-A^{bsr} zur Verfügung standen.

Abbildung 46A zeigt das Ergebnis nach der Durchführung des Retrotranspositionstests mit dem genetisch markierten DGLT-A-Element nach Transformation in die RrpC-Mutante. Die gezeigte Platte mit Blasticidin-resistenten-Klonen steht repräsentativ für die Beobachtungen während der Blasticidin-Selektion der mit DGLT-A^{bsr} transformierten Zellen. DGLT-A^{bsr} zeigte durchschnittlich 5-10 Klone pro Platte. Im Vergleich zeigen die Ergebnisse von Siol et al. 2011, dass das unter 3.5 beschriebene TRE5-A^{bsr}-Element ca. 460 Blasticidin-resistente Klone pro Platte erzeugt, wenn 1×10^7 -Zellen eingesetzt werden. Somit stellte sich die Frage, ob das DGLT-A^{bsr}-Element entweder schwächer exprimiert wurde oder insgesamt eine wesentlich geringere Retrotranspositionsfrequenz hat. Im Gegensatz zu dem TRE5-A^{bsr}-Element besitzt DGLT-A^{bsr} nämlich nicht den artifiziellen Actin-6-Promotor, welcher den Gewinn an Blasticidin-resistenten Klonen und somit die Aktivität von TRE5-A^{bsr} steigert (Siol et al. 2011), sondern wird von seinem eigenen LTR exprimiert. Das Element ist zwar aktiv und besitzt die Fähigkeit eine komplette Retrotransposition durchzuführen, jedoch sollte bedacht werden, dass die Blasticidin-resistenten Klone, die bei der Durchführung des Retrotranspositionstests entstehen, nur die Sprungereignisse zeigen, bei denen das Intron des *mbsrI*-Gens während der Retrotransposition erfolgreich herausgespleißt werden konnte. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass das DGLT-A^{bsr}-Element eine höhere Retrotranspositionsfrequenz aufweist, da es möglich ist, dass manche Elemente zwar transponieren, durch die eventuellen Probleme beim Spleißen des *mbsrI*-Gens aber keine Blasticidin-Resistenz aufbauen können. Es resultiert also eine Dunkelziffer an Retrotranspositionen, die durch die Blasticidin-Selektion nicht angereichert werden kann. Um mögliche Probleme im Spleiß-Vorgang zu überprüfen wurde das DGLT-A^{bsr}-Element in die RrpC-Mutante transformiert. Es wurden die G418-resistenten Zellen gepoolt, RNA isoliert und daraus cDNA synthetisiert. Um die Transkripte von DGLT-A^{bsr} zu analysieren, wurde daraufhin eine PCR mit den Oligonukleotiden bsr-test-02/bsr-19 durchgeführt, welche zu einer Fragmentgröße von 466 bp (mit Intron) oder 392 bp (ohne Intron) führte (Abbildung 46B).

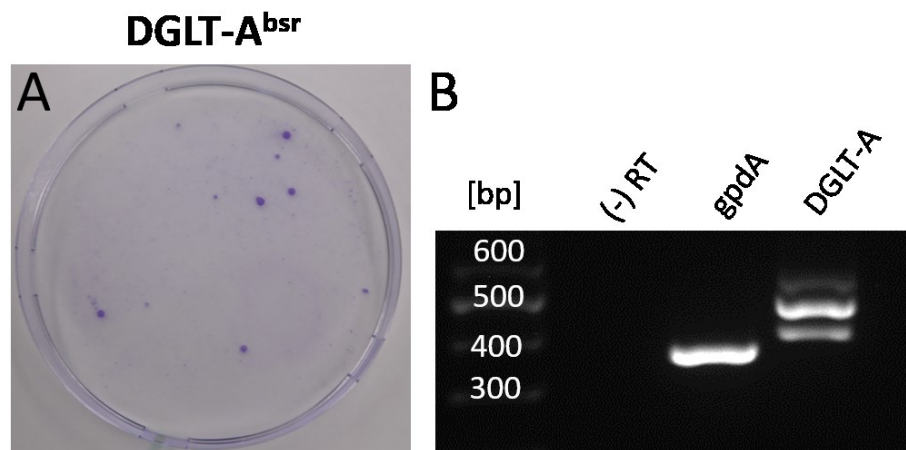


Abbildung 46: Analyse der Transkripte von DGLT-A^{bsr} mittels RT-PCR

A: Petrischale aus der Zellkultur mit angefärbten Blastocidin-resistenten Klonen nach dem Retrotranspositionstest mit DGLT-A^{bsr}. **B:** RT-PCR an cDNA von *D. discoideum* nach dem Retrotranspositionstest. Negativkontrolle: es wurde keine Reversen Transkriptase beim Umschreiben von RNA in cDNA eingesetzt. Eine PCR an dieser Probe erfolgte mit den unten aufgeführten DGLT-A-Primern. Positivkontrolle: gpdA (Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase) mit den Primern gpdA-qRT-01/ gpdA-qRT-02, DGLT-A: PCR mit den Primern bsr-test-02/bsr-19

Die RT-PCR an der cDNA des Elements lässt vermuten, dass es sich um ein Problem des Spleißens handelt, da die Primer für die PCR so gewählt wurden, dass sie einen Bereich über dem Intron amplifizieren und die untere Bande weniger intensiv erscheint. Um dieses Ergebnis vergleichen zu können wurde dieser Versuch zusätzlich unter gleichen Bedingungen und parallel mit einem anderen genetisch markierten LTR-Retrotransposon namens Skipper-1^{bsr} durchgeführt.

3.5.2 Skipper-1-Retrotransposon in *Dictyostelium discoideum*

Das *D. discoideum*-Retrotransposon Skipper-1 gehört, ebenso wie DGLT-A, zu der Klasse der Ty3/Gypsy-ähnlichen LTR-Retrotransposons (Leng *et al.* 1998). Es ist ca. 7000 bp lang und besteht im Gegensatz zu DGLT-A aus zwei ORFs, im gleichen Leseraster. Sie codieren die zur Retrotransposition benötigten Proteine (siehe Abbildung 47). ORF1 codiert für das Gag-Protein. Der zweite ORF codiert für die Protease-, RT-RNH- und IN-Domäne. Auffallend ist zudem, dass das Element, im Gegensatz zu DGLT-A, am C-Terminus der Integrase verlängert ist. Hier findet sich eine zusätzliche Chromodomäne, die bei DGLT-A nicht zu finden ist und auf

die später noch genauer eingegangen wird. Das Element wird schließlich von zwei LTRs flankiert die jeweils 390 bp lang sind (Glöckner *et al.* 2001, Leng *et al.* 1998).

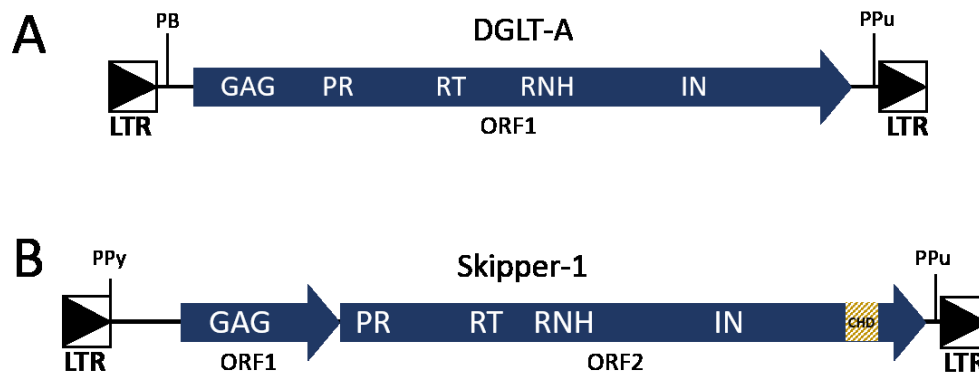


Abbildung 47: Schematische Darstellung der LTR-Retrotransposons DGLT-A und Skipper-1

Überblick der zwei LTR-Retrotransposons DGLT-A und Skipper-1 aus *D. discoideum*. GAG: *group-specific antigen*; PR: Protease, RT: Reverse Transkriptase; RNH: RNase-H-Domäne; IN: Integrase; LTR: *long-terminal repeats*; die PB - tRNA-Primer-Bindestelle - welche typisch für Ty3/gypsy-Retrotransposons ist, ist bei Skipper-1 ersetzt durch eine Polypyrimidin Sequenz (PPy). CHD: Chromodomäne; PPU: Polypurin-Bindestelle

Genomanalysen zeigten, dass Skipper-1 mit ungefähr 50 kompletten Kopien und 10 Solo-LTRs im Genom von *D. discoideum* vorkommt (Glöckner *et al.* 2001). Da auch mit diesem Element ein Retrotranspositionstest durchgeführt werden sollte, um gegebenenfalls die Ortsspezifität der Retrotransposition von DGLT-A und Skipper-1 vergleichen zu können, wurde ein artifizielles, genetisch markiertes Skipper-1-Element benötigt. Durch die Existenz eines intakten ORFs und somit der Fähigkeit zur Retrotransposition von Skipper-1 im Genom von *D. discoideum* konnte dieses, anders als bei DGLT-A, jedoch direkt und komplett aus dem Genom des AX2-Stammes von *D. discoideum* ausgewählt und mittels PCR amplifiziert werden.

3.5.2.1 Das genetisch markierte Skipper-1 Retrotransposon

Für die Klonierung des Skipper-1^{bsr}-Elements wurde ein intaktes Element auf Chromosom 1 im Genom von *D. discoideum* ausgewählt (dictyBase-Gene-ID: DDB-G0270954) und mit den Primern Skipper-01 und Skipper-02_AgeI eine PCR an genomischer DNA von AX2 durchgeführt. Dabei wurde das 5'-LTR inklusive der beiden ORFs amplifiziert. Dieses Fragment wurde in den Vektor pCR/XL/TOPO kloniert. Danach wurde die *mbsrI*-Kassette als AgeI/PstI-Fragment aus dem oben beschriebenen TRE5-A^{bsr}-Retrotransposon geschnitten und

über interne PstI-Schnittstellen des pCR/XL/TOPO-Vektors an das zuvor klonierte Skipper-1-Element fusioniert. Der 3'-LTR wurde an genomischer DNA mit den Primern Skipper-03 und Skipper-04 amplifiziert und in den Vektor pGEM-T subkloniert. Zum Schluss wurden mittels PstI-Schnittstellen der 3'-LTR in den pCR/XL/TOPO-Vektor kloniert (Spaller 2015) (siehe Abbildung 48).

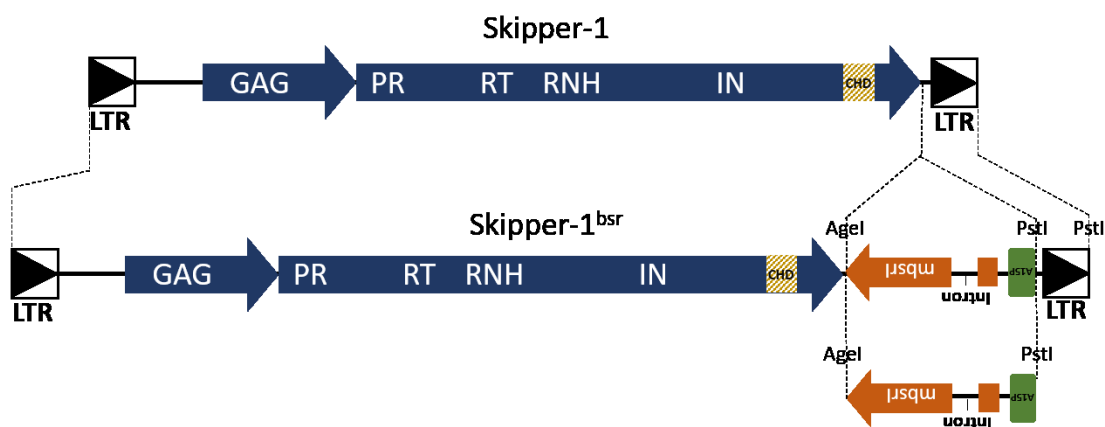


Abbildung 48: Klonierungsstrategie für das genetisch markierte Retrotransposon Skipper-1

Die Klonierung des 5'-LTR inklusive der zwei ORFs von Skipper-1 erfolgte direkt an genomischer DNA. Die *mbsr*-Kassette wurde als Agel/PstI-Fragment in das Element eingefügt. Abbildung nach Spaller 2015.

Das fertige Skipper-1^{bsr} wurde daraufhin auf seine Retrotranspositionskompetenz getestet. Es wurde zunächst überprüft, ob das genetisch markierte Skipper-1 in RrpC-Zellen zur Retrotransposition fähig ist. Dazu wurde das Skipper-1^{bsr}-Element in RrpC-Knockout-Zellen transformiert und es wurden Zellen isoliert, die aufgrund der Skipper-1^{bsr}-Retrotransposition Blasticidin-Resistenz erworben hatten. Abbildung 49 zeigt die typische Doppelbande, die mittels PCR-Analyse entsteht, wenn das Intron während der Retrotransposition des Elements aus der Plusstrang-RNA herausgespleißt wird.

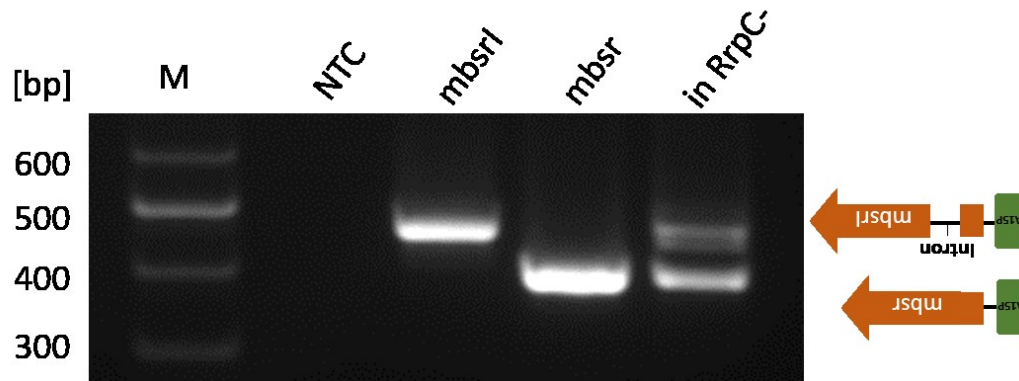


Abbildung 49: Nachweis der Mobilisierung des genetisch markierten Skipper-1^{bsr}

Nachweis, dass Skipper-1^{bsr} im Genom von *D. discoideum* „gesprungen“ ist. Amplifizierter Bereich mit Intron: 466 bp, ohne Intron 392 bp. Verwendete Primer: bsr-test-02 und bsr-19; NTC: *no template controle*, mbsrI: Blasticidin-Resistenzkassette mit Intron, mbsr: Blasticidin-Resistenzkassette ohne Intron, CHD: Chromodomäne, PPy: Polypyrimidin, PPu: Polypurine

Weiterhin wurde festgestellt, dass während der Durchführung des Retrotranspositionstests das Skipper-1^{bsr}-Element durchschnittlich 50-100 Blasticidin-resistente Klone pro Platte zeigte (siehe Abbildung 50A). Es scheint also, dass das Skipper-1^{bsr}-Element aktiver ist als DGLT-A^{bsr}, da dieses 5-10 mal so viele Retrotranspositionereignisse aufweist (vergleiche Abbildung 50A und Abbildung 46A). Um die Aktivität beider artifiziieller Elemente vergleichen zu können und Rückschlüsse auf den Spleiß-Vorgang des *bsr*-Introns ziehen zu können, wurden die Transkripte von Skipper-1^{bsr} daraufhin parallel und unter gleichen Bedingungen mit denen von DGLT-A^{bsr} untersucht (Beschreibung zur Durchführung unter 3.5.1.1).

Beim Vergleich der Ergebnisse der RT-PCR an der cDNA von Skipper-1 und DGLT-A (siehe Abschnitt 3.5.1.1) ist zu sehen, dass die untere Bande bei Skipper-1 intensiver erscheint als bei DGLT-A. Dies deutet darauf hin, dass mehr funktionelle Blasticidin-RNA in den Zellen existieren könnte als von DGLT-A und lässt vermuten, dass der Grund für die geringe Aktivität von DGLT-A^{bsr} tatsächlich ein Problem des Spleißens sein könnte. Theoretisch müsste die Zahl von Retrotranspositionereignissen von DGLT-A^{bsr} zunehmen, wenn die Zellen über unterschiedlich lange Zeiträume kultiviert werden. Dafür wurden mit Skipper1^{bsr} und DGLT-A^{bsr} transformierte RrpC-Stämme für 30 Tage unter G418-Selektion gehalten, bevor danach wieder auf Blasticidin-resistente Zellen selektioniert wurde. Die Anzahl der dabei erhaltenen resistenten Klone war jedoch sowohl bei Skipper-1^{bsr} als auch bei DGLT-A^{bsr} ähnlich (Daten nicht gezeigt). Eine anschließende RT-PCR an diesen Transkripten lieferte das gleiche

Ergebnis wie es in Abbildung 46B und Abbildung 50B zu sehen ist. Es war auch nach ca. 60 Generationen weiterhin keine Veränderung in der Intensität der unteren Bande zu sehen (Daten nicht gezeigt). Es bedarf demnach der Etablierung der Methode des Retrotranspositionstests mit DGLT-A^{bsr}, um eine Verbesserung der Retrotranspositionsaktivität zu erhalten und damit positionsspezifische Integrationen des DGLT-A-Elements identifizieren zu können.

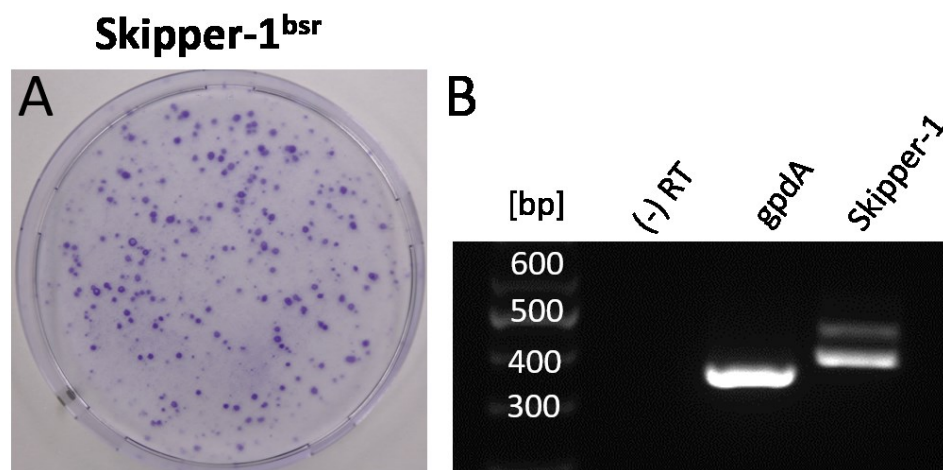


Abbildung 50: Analyse der Transkripte von Skipper-1^{bsr} mittels RT-PCR

A: Petrischale aus der Zellkultur mit angefärbten Blasticidin-Resistenten Klonen nach dem Retrotranspositionstest mit Skipper-1^{bsr}. **B:** RT-PCR an cDNA von *D. discoideum* nach dem Retrotranspositionstest. Negativkontrolle: es wurde keine Reversen Transkriptase beim Umschreiben von RNA in cDNA eingesetzt. Für die PCR wurden die unten aufgeführten DGLT-A-Primer verwendet. Positivkontrolle: gpdA (Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase) mit den Primern gpdA-qRT-01/ gpdA-qRT-02, DGLT-A: bsr-test-02/bsr-19

3.6 Die Chromodomäne von Skipper

DGLT-A und Skipper-1 sind beide Ty3/gypsy-Typ LTR-Retrotransposons und in den Hauptdomänen RT-RNH-IN zu 34 % miteinander identisch, jedoch zeigen sie zwei völlig verschiedene Integrationspezifitäten im Genom von *D. discoideum*. Während DGLT-A 15-18 bp vor tRNA-Gene integriert, transponiert Skipper-1 in centromere Regionen (Glöckner und Heidel 2009, Spaller *et al.* 2016). Im folgenden Abschnitt soll daher genauer untersucht werden, warum Skipper-1 diese Integrationspräferenz besitzt.

Skipper-1 ist der Prototyp eines Chromovirus im Genom von *D. discoideum*. Als „Chromoviren“ werden Ty3/gypsy-Retrotransposons bezeichnet, die am C-Terminus der Integrase-Domäne eine Chromodomäne besitzen. Vergleicht man die Integrase-Domänen zwischen DGLT-A und Skipper-1, so findet man am Ende der Integrase das typische GPY/F-Motiv in beiden Elementen. Der Bereich danach variiert jedoch in der Länge. Während DGLT-A nur eine Erweiterung der Integrase um 32 Aminosäuren besitzt, ist das C-terminale Ende bei Skipper-1 183 Aminosäuren lang. In diesem Bereich befindet sich die Chromodomäne, welche bei DGLT-A fehlt (Spaller *et al.* 2016). Es wird vermutet, dass die Chromodomäne dafür verantwortlich ist, dass das Skipper-1-Element zielgerichtet in Bereiche mit Heterochromatin – in Centromere - integriert, wo es bis zu 10 % der Centromerlänge ausmacht (Gao *et al.* 2008, Glöckner und Heidel 2009). Durch die heterochromatischen Eigenschaften der Centromer-DNA in *D. discoideum* und die Anwesenheit von H3K9-Methylierung (Kaller *et al.* 2007), wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Chromodomäne von Skipper-1 an methyliertes H3K9 bindet und das Element auf diese Weise in heterochromatischen Bereichen akkumuliert.

Ein weiteres Argument für diese Hypothese lieferten phylogenetische Analysen von LTR-Retrotransposons aus den Genomen von sozialen Amöben. Für diese Analyse wurden LTR-Retrotransposons aus den Genomsequenzen bisher sequenzierter Spezies extrahiert und Alignments der konkatenierten Aminosäuresequenzen der Hauptdomänen RT-RNH und IN phylogenetisch analysiert. Verwendet wurden Sequenzen der LTR-Retrotransposons der DGLT-A- und Skipper-Familie aus *D. discoideum* (Dd), *D. purpureum* (Dp), *D. lacteum* (Dl), *D. fasciculatum* (Df), *P. pallidum* (Pp) und *Protostelium. fungivorum* (Pm) (Spaller *et al.* 2016). Es fiel auf, dass sich die Skipper-Elemente in zwei Unterfamilien aufteilen (siehe Abbildung 51).

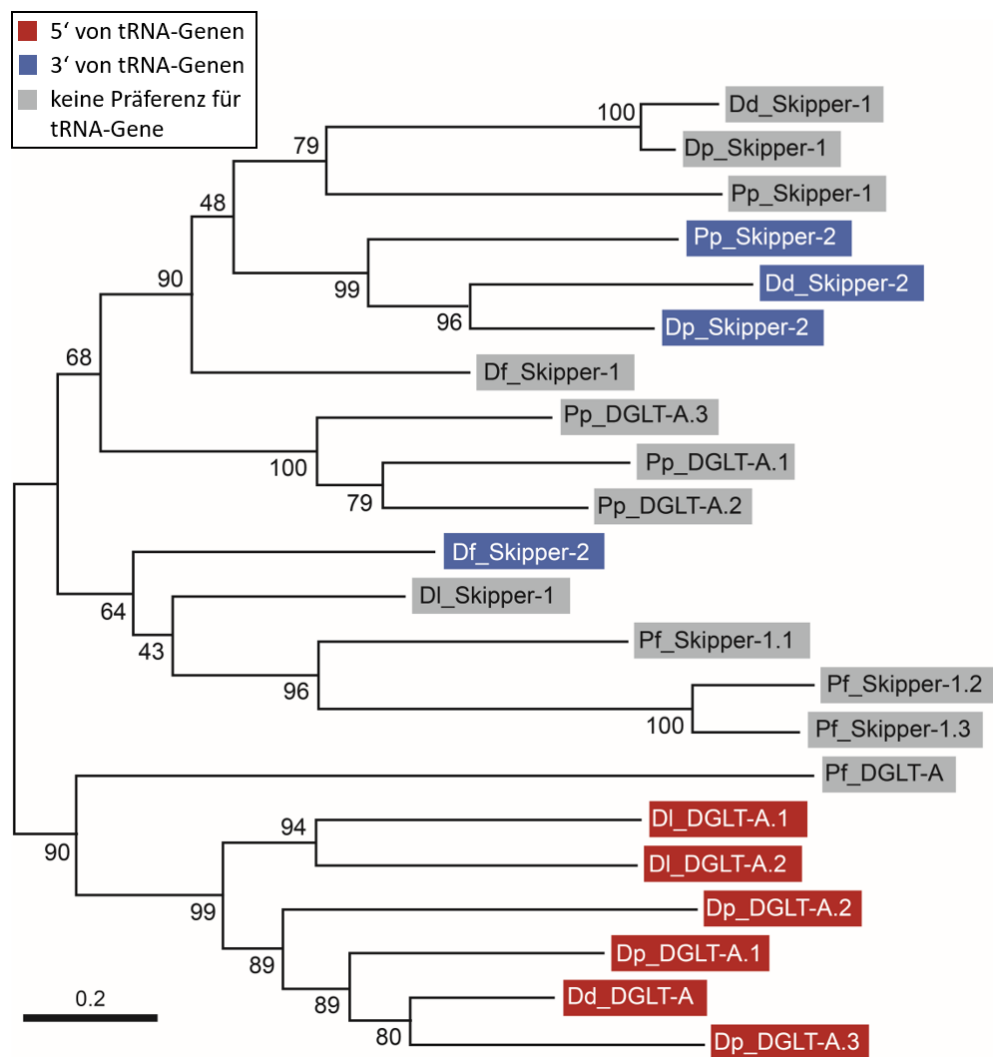


Abbildung 51: Phylogenie der LTR-Retrotransposons aus Dictyosteliden

Das Alignment der konkatenierten Domänen RT, RNH und IN wurde mit ClustalX generiert; der Maximum-Likelihood-Methode analysiert und mittels Bootstrap überprüft. LTR-Retrotransposons die vor und hinter tRNA-Gene integrieren sind rot und blau markiert. Elemente mit keiner tRNA-Gen-Präferenz sind grau hinterlegt. *D. discoideum* (Dd), *D. purpureum* (Dp), *D. lacteum* (Dl), *D. fasciculatum* (Df), *P. pallidum* (Pp) und *Protostelium fungivorum* (Pm). Nach Spaller *et al.* 2016

Man konnte unterscheiden zwischen den Skipper-1-Elementen und den Skipper-2-Elementen, wobei letztere ausnahmslos hinter tRNA-Genen zu finden waren. Im Gegensatz zu DGLT-A-Elementen zeigen alle Skipper-Elemente eine Verlängerung der C-terminalen Domäne der Integrase im Bereich von 99 und 192 Aminosäuren und eine darin befindliche Chromodomäne (CHD). Die Chromodomänen beider Skipper-Elemente wurden daraufhin mit dem Prototyp einer Chromodomäne (CHD) bzw. einer *Chromoshadow*-Domäne (CSD) des Heterochromatin-Proteins 1 (HP1) aus *D. discoideum* verglichen.

HP1-Proteine sind in der Lage, heterochromatische Bereiche zu erkennen und dienen daher als Adapter zwischen diesen und anderen Komplexen. Der Aufbau dieser konservierten Proteine folgt immer nach dem gleichen Prinzip. Sie besitzen eine N-terminale Chromodomäne (CHD), welche an eine charakteristische Heterochromatin-Markierung bindet. Es handelt sich hierbei um das Histon H3 mit methyliertem Lysin an Position 9 (H3K9) (Bannister *et al.* 2001, Lachner *et al.* 2001). Zudem besitzen sie eine C-terminale *Chromoshadow*-Domäne (CSD), die als Interaktionsmodul agiert und neben Homo- und Heterooligomeren von HP1 auch andere Proteine binden kann (Smothers und Henikoff 2000). Beide Domänen sind durch ein sogenanntes „Scharnier“ (*hinge*) miteinander verbunden. Diese Linker-Region besitzt die Fähigkeit DNA und RNA zu binden und wirkt bei der Erkennung von Heterochromatin mit (Muchardt *et al.* 2002, Zhao *et al.* 2000). Im Genom von *D. discoideum* wurden bisher drei Isoformen des HP1-Proteins gefunden, HcpA, HcpB und HcpC, welche alle den typischen Aufbau zeigen, jedoch bisher nur für die ersten beiden Varianten eine Expression nachgewiesen werden konnte (Kaller *et al.* 2006).

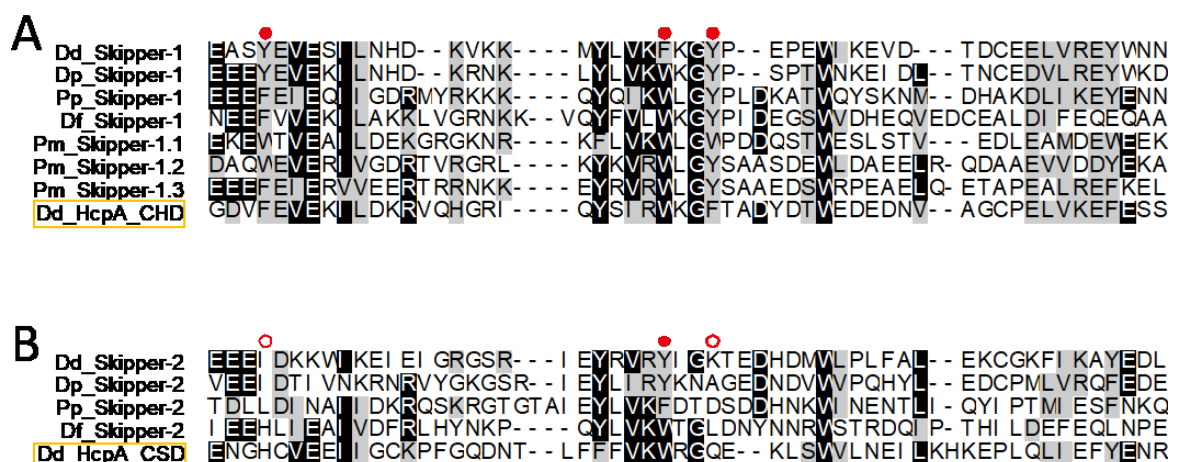


Abbildung 52: Alignment der Chromodomäne verschiedener Skipper-Retrotransposons aus Dictyosteliden

A: Alignment zwischen verschiedenen Chromodomänen von Skipper-1-Elementen aus verschiedenen Organismen und der Chromodomäne (CHD) des Heterochromatin-Protein (HcpA) aus *D. discoideum* als Vergleich (gelb umrandet). **B:** Alignment zwischen verschiedenen CHD von Skipper-2-Elementen aus verschiedenen Organismen und der *chromo shadow domain* (CSD) von HcpA aus *D. discoideum* als Vergleich (gelb umrandet). schwarzen Boxen: gleichbleibende Aminosäuren, grauen Boxen: ähnliche Aminosäuren, rote Punkte: aromatische Aminosäuren für die Bildung des „Käfigs“, rote, unausgefüllte Punkte: keine aromatischen Aminosäuren. Dd: *Dictyostelium discoideum*, Dp: *Dictyostelium purpureum*, Dl: *Dictyostelium lacteum*, Df: *Dictyostelium fasciculatum*, Pp: *Polysphondylium pallidum*, Pm: *Protostelium fungivorum*

Abbildung 52 zeigt ein Alignment zwischen den Chromodomänen der Skipper-1- und Skipper-2-Elemente mit der CHD und CSD von HcpA. Interessanterweise sahen alle Chromodomänen der Skipper-2-Elemente der HcpA-CSD ähnlicher als der HcpA-CHD. Dies mag daran liegen, dass in der funktionsfähigen CHD von HcpA drei konservierte, aromatische Aminosäuren zu finden sind, die eine Art „Käfig“ bilden können und somit für die Bindung an H3K9 verantwortlich sind (Blus *et al.* 2011). In der CHD der Skipper-2-Elemente fehlen zwei dieser drei Aminosäuren an den erwarteten Positionen, weshalb die Skipper-2-CHD mehr der CSD ähnelt (siehe Abbildung 52B).

Die Skipper-1-CHD der unterschiedlichen Arten entsprechen hingegen einer typischen, kanonischen Chromodomäne, wie sie auch in HcpA zu finden ist. In jeder CHD der einzelnen Skipper-1-Elemente sind die drei aromatischen Aminosäuren zu finden (Abbildung 52A, rote Punkte). Dies lässt vermuten, dass die Chromodomänen der Skipper-1-Elemente möglicherweise methyliertes H3K9 erkennen können und somit die Retrotransposons in heterochromatische Bereiche, Centromere, leiten.

3.6.1 Interaktionsanalysen zwischen Dd-Skipper-1-CHD und methyliertem H3a *in vitro*

Um *in vitro* analysieren zu können, ob die Chromodomäne von Skipper-1 aus *D. discoideum* an H3K9 bindet, wurde ein Peptid-Protein-Pulldown durchgeführt. Dafür wurde die Chromodomäne von Skipper-1 mit einem GFP-Tag (GFP-Sk1-CHD) am N-Terminus des Proteins versehen, dieses Konstrukt heterolog in *E.coli*-Zellen exprimiert und anschließend aufgereinigt. Als Köder für den Pulldown dienten drei Peptide, die den N-Terminus des *D. discoideum*-Histons H3a und zwei Modifikationen desselben, H3K4me3 und H3K9me3, nachbilden (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16: Auflistung der verwendeten Peptide für den Pulldown

| Name | Primärstruktur |
|---------|---------------------------------------|
| H3a | ARTKQTARKSTGAKVPRKHIGSKQGGK(bio) |
| H3K4me3 | ARTK(me3)QTARKSTGAKVPRKHIGSKQGGK(bio) |
| H3K9me3 | ARTKQTARK(me3)STGAKVPRKHIGSKQGGK(bio) |
| TBP-H2' | GAKVREEIYEAFFENIYPVLSAFKKVNAITQK(bio) |

Da die Peptide am C-Terminus biotinyliert (bio) waren, wurden für die Durchführung des *Pulldowns* magnetische Streptavidin-*Beads* verwendet. Die Peptide wurden an die magnetischen *Beads* gebunden, bevor der mögliche Interaktionspartner GFP-Sk1-CHD hinzugefügt wurde. Die Detektion erfolgte mittels Western Blot und Anti-GFP-Antikörper.

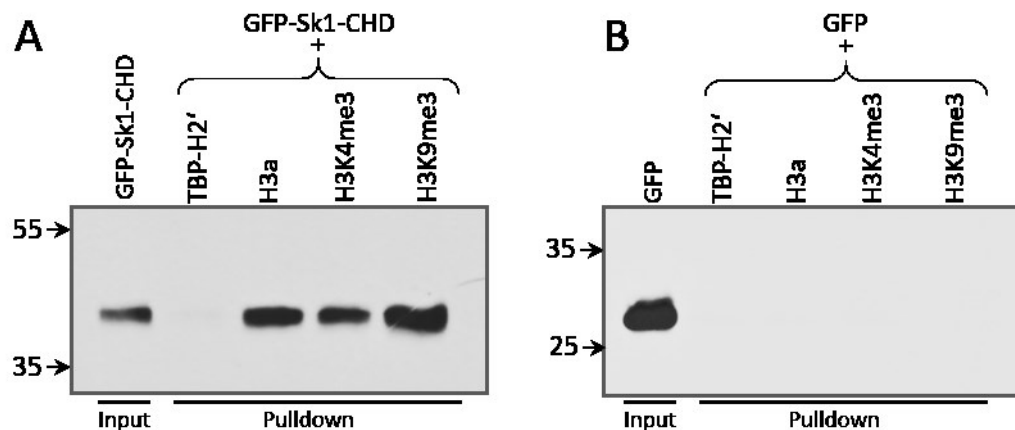


Abbildung 53: Peptid-Protein-Pull-down zwischen Skipper-1-CHD und methyliertem, modifiziertem H3a

Interaktionsanalyse mittels Peptid-Protein-Pull-down. Getestet wurde, ob die Chromodomäne von Skipper-1 an unterschiedlich methyliertes H3a bindet. **A:** Der Input zeigt die heterolog exprimierte, alleinige GFP-getaggte Chromodomäne von Skipper-1. In den weiteren vier Spuren wurden die biotinylierten Peptide an Streptavidin-*Beads* gekoppelt. Danach wurde GFP-Sk1-CHD-Protein als möglicher Interaktionspartner hinzugegeben und der *Pull-down* durchgeführt. Als Negativkontrolle diente ein biotinyliertes Peptid, das der Helix H2' des TBP-Proteins aus *D. discoideum* entspricht. Proteinmasse von GFP-Sk1-CHD: 40,1 kDa. **B:** *Pull-down* um auszuschließen, dass nicht GFP für die Bindung an H3a und dessen Modifikationen verantwortlich ist. Aufbau des Sets ist identisch zu A. Proteinmasse (Lexsy)-GFP: 27,7 kDa

Abbildung 53A zeigt, dass die mit GFP getaggte Chromodomäne von Skipper-1 sowohl an H3a, als auch an H3K4me3 und H3K9me3 bindet. Als Negativkontrolle diente ein 31 Aminosäuren langes biotinyliertes Peptid, das der Helix H2' des TBP-Proteins aus *D. discoideum* entspricht, und dem ORF1-Protein von TRE5-A als Interaktionspartner dient, um spezifisch vor tRNA-Gene zu integrieren (Chung *et al.* 2007). Um auszuschließen, dass nur das GFP-Protein an die jeweiligen H3-Peptide bindet, wurde zudem ein *Pull-down* durchgeführt, in dem dieses alleinig gegen die jeweiligen Peptide getestet wurde. Es wurde beobachtet, dass weder H3a noch H3K4me3 oder H3K9me3 nur mit GFP interagieren (siehe Abbildung 53B). Demnach kann man mittels der Analysen *in vitro* vermuten, dass die Chromodomäne von Skipper-1 eine Spezifität gegenüber dem Histon H3a und dessen Modifikationen hat. Allerdings muss man hier stark

zwischen den beiden methylierten Varianten unterscheiden. Während H3K9 ein typischer Marker für Heterochromatin ist, ist die dreifache Methylierung von Lysin an Position 4 des Histon 3 (H3K4me3) genau das Gegenteil. Diese Modifikation definiert einen aktiven Zustand der Genexpression im Zellkern und kann demnach als Marker für Euchromatin verstanden werden (Santos-Rosa *et al.* 2002). Dass die Chromodomäne von Skipper-1 *in vitro* an beide dieser H3-Modifikationen bindet, bestätigt zwar nicht die Hypothese, dass die Sk1-CHD H3K9-Markierungen im Heterochromatin erkennt und diese deshalb das Skipper-1-Element in Centromere leitet, es widerlegt diese jedoch auch nicht. Deshalb wurden zusätzlich Untersuchungen *in vivo* zu diesem Thema durchgeführt.

3.6.2 *In vivo*-Interaktionsanalysen zur Chromodomäne von Skipper-1 in *D. discoideum*

Um Interaktionsanalysen mit der Chromodomäne aus Skipper-1 *in vivo* beobachten zu können, wurde zuerst das *HcpA*-Gen aus dem AX2-Stamm von *D. discoideum* isoliert. Dafür wurde eine PCR mit den Primern HcpA-01 und HcpA-02 an genomischer DNA durchgeführt und das amplifizierte Fragment in pGEM-T subkloniert. Anschließend wurde das Gen in einen Expressionsvektor für *D. discoideum* kloniert. Dieser Vektor namens pDM324 besitzt ein *red fluorescent protein* (RFP)-tag, welches am C-Terminus des mit den Restriktionsenzymen BglII/Spel eingebrachten Gens fusioniert ist. Dabei handelt es sich um das sogenannte *mRFPmars*, welches eine neue Version des *DsRed* darstellt und besonders im Organismus von *D. discoideum* gute Fluoreszenznachweise erbringen kann (Fischer *et al.* 2004). Das fertige Plasmid wurde daraufhin in den AX2-Stamm transformiert. Abbildung 54 zeigt die Expression von HcpA-mRFPmars in den *D. discoideum* Zellen. Die Fluoreszenz von HcpA-RFP wurde bei der Aufnahme von lebenden Zellen am intensivsten gesehen (Abbildung 54A). Da lebende *D. discoideum*-Zellen jedoch keine Markierung der DNA mittels DAPI-Färbung zulassen, wurden zudem Aufnahmen mit fixierten Zellen getätigt (Abbildung 54).

Sowohl in den lebend mikroskopierten Zellen, als auch den fixierten Zellen ließ sich ein intensiver, rot leuchtender Punkt in der Zellkernperipherie erkennen. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um die Centromere. In *D. discoideum* *clustern* diese nämlich nicht nur während der Mitose, sondern auch während der Interphase im Zellkern (Eichinger *et al.* 2005). Da das RFP-fusionierte HcpA-Protein mit dem Heterochromatin interagiert, war zu erwarten, dass, nach der Expression dieses Proteins und anschließender Mikroskopie, ein intensiver roter Punkt innerhalb des Zellkerns ersichtlich wird. Die DAPI-Färbung und somit die Markierung von DNA in Abbildung 54B bestätigt zudem die Lokalisation im Zellkern.

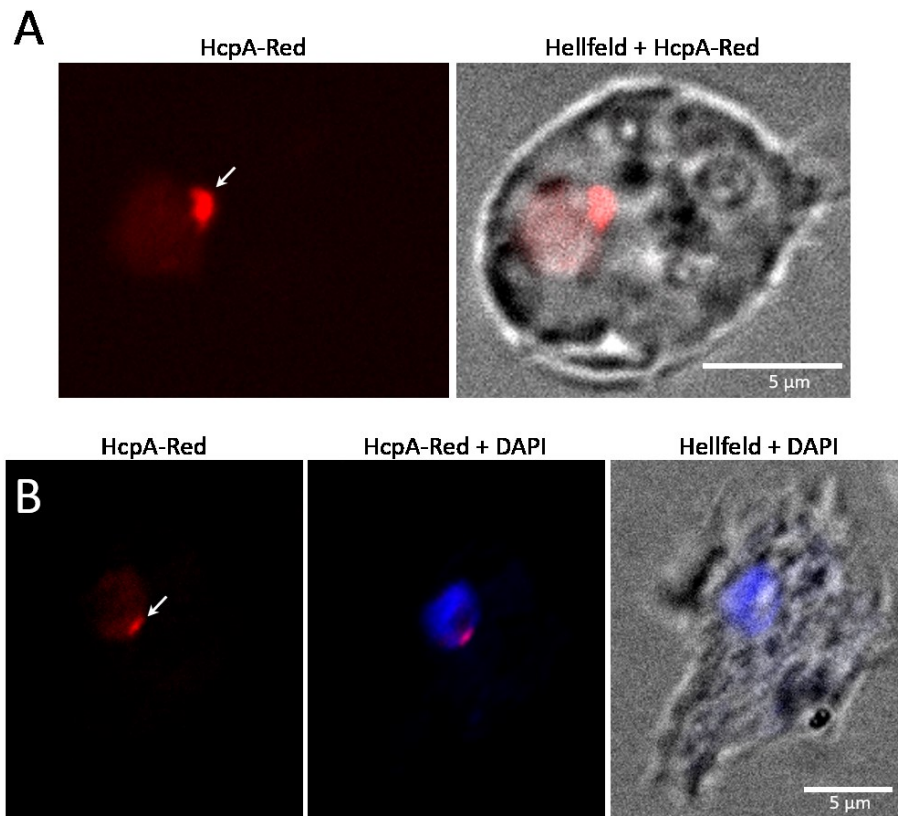


Abbildung 54: Expression von HcpA-mRFPmars in AX2

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *D. discoideum*-Zellen (AX2) mit dem exprimierten HcpA-mRFPmars Protein. **A:** Aufnahme lebender Zellen **B:** Aufnahme fixierter Zellen inklusive DAPI Färbung (DAPI=DNA). Pfeil: exprimiertes HcpA-Red-Protein im Zellkern.

Da es mit Hilfe des exprimierten HcpA-mRFPmars Proteins möglich war, Heterochromatin in den Zellen von *D. discoideum* zu identifizieren, wurde daraufhin versucht, die mögliche Interaktion zwischen der Chromodomäne von Skipper-1 und dem Heterochromatin in *D. discoideum* genauer zu analysieren. Dafür wurden verschiedene Skipper-1-CHD-Konstrukte in den Expressionsvektor pDM358 kloniert (Veltman *et al.* 2009). Alle Konstrukte wurden zudem mit einem GFP-Tag und einem Kernlokalisierungssignal (*nuclear localization signal*, NLS) am N-Terminus versehen.

Abbildung 55A zeigt das erste Konstrukt, mit dem eine mögliche Interaktion im Zellkern ersichtlich werden sollte. Es handelt sich dabei um die reine Chromodomäne aus Skipper-1, welche auch für die Interaktionsanalyse mittels *Pulldown* (siehe Abschnitt 3.6.1) eingesetzt wurde.

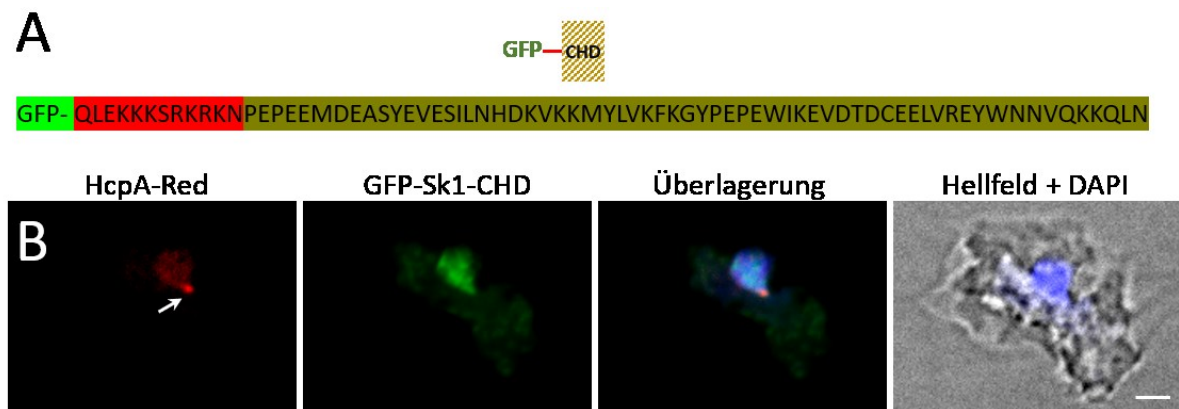


Abbildung 55: Expression von GFP-Skipper1-CHD und HcpA-mRFPmars in AX2

A: Schematische Abbildung und Aminosäuresequenz des eingebrachten Skipper-1-CHD-Konstrukts. Die rot markierten 12 Aminosäuren definieren die NLS. Chromodomäne aus Skipper-1 ist Bronze-farben unterlegt.

B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *D. discoideum*-Zellen (AX2), welche HcpA-mRFPmars und GFP-Skipper-1-CHD exprimieren. Überlagerung zeigt exprimiertes HcpA-Red, GFP-Sk1-CHD und DAPI um den Zellkern zu lokalisieren. Der Größenbalken zeigt 2,5 µm an. Pfeil: exprimiertes HcpA-Red-Protein

Die Zellen von *D. discoideum* (AX2) wurden daraufhin sowohl mit dem HcpA-mRFPmars, als auch mit dem Skipper-1-CHD-Plasmid transformiert. Da beide Plasmide eine unterschiedliche Resistenz hatten, wurden die Zellen unter doppelter Selektion gehalten. Dabei wurde dem Medium 8 µg/ml G418 und 50 µg/ml Hygromycin zugeführt. Kurz vor der Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen fixiert, um eine zusätzliche DAPI-Färbung zu erhalten. Es wurde beobachtet, dass HcpA-mRFPmars weiterhin an der Zellkernperipherie akkumuliert und dass das GFP-Sk1-CHD-Konstrukt zwar exprimiert wird, allerdings sehr unspezifisch in der gesamten Zelle zu finden war. Ein intensiv leuchtender grüner Punkt im Zellkern bzw. dessen Peripherie konnte ebenfalls nicht beobachtet werden. Auch bei der Überlagerung der einzelnen Kanäle konnte keine eindeutige Aussagen über eine Kolo-kalisation von rotem HcpA und grünem Skipper-1-CHD-Protein getroffen werden (siehe Abbildung 55B).

Daraufhin wurde die Expression eines weiteren CHD-Konstruktes in den Zellen von *D. discoideum* getestet. Die Überlegung war hierbei, dass der verlängerte C-terminale Teil der Integrase von Skipper-1, in dem die Chromodomäne liegt, womöglich auch einen Beitrag dazu leistet, dass das Retrotransposon zielgerichtet in Heterochromatin integriert. Somit wurde ein Teil der Integrase inklusive der Chromodomäne in pDM358 kloniert (siehe Abbildung 56A).

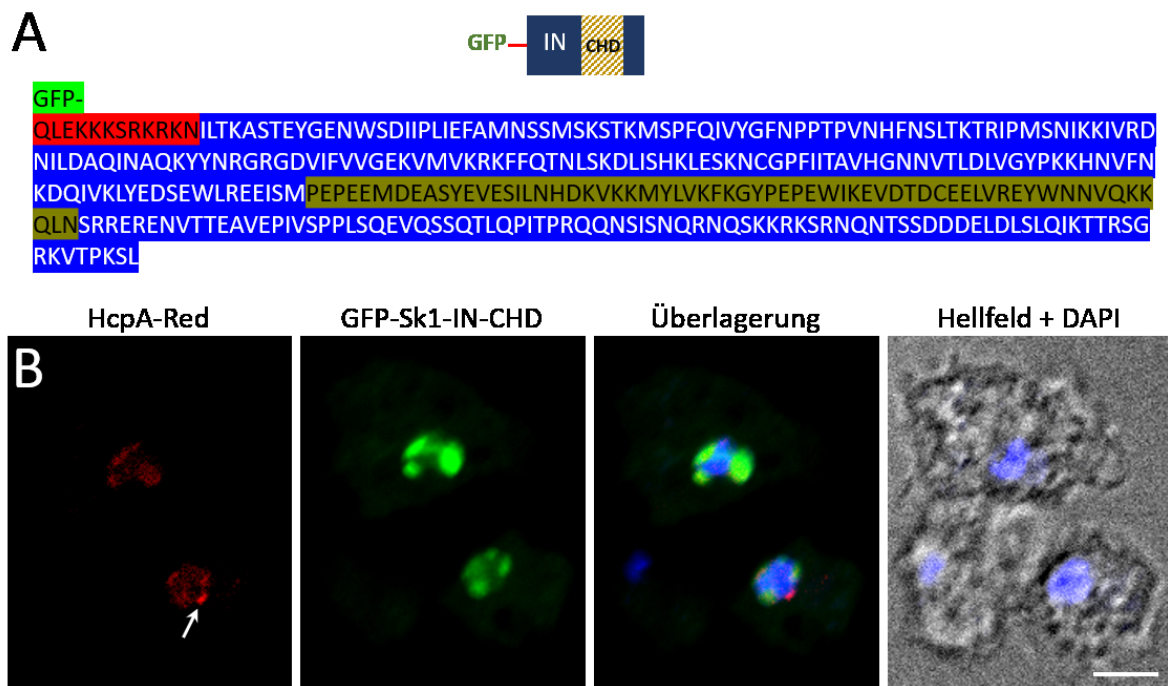


Abbildung 56: Expression von GFP-Skipper1-IN-CHD und HcpA-mRFPmars in AX2

A: Schematische Abbildung und Aminosäuresequenz des eingebrachten Skipper-1-IN-CHD-Konstrukts. Die rot markierten 12 Aminosäuren definieren die NLS. Ein Teil der Skipper-1-Integrase ist blau eingefärbt, die Chromodomäne ist Bronze-farben unterlegt. **B:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von exprimiertem GFP-Skipper-1-IN-CHD und HcpA-mRFPmars. Die Überlagerung zeigt exprimiertes HcpA-Red, GFP-Sk1-IN-CHD und DAPI um den Zellkern zu lokalisieren. Der Größenbalken zeigt 5 μ m an. Pfeil: exprimiertes HcpA-Red

Bei diesem Experiment konnte beobachtet werden, dass die verlängerte GFP-IN-CHD ein anderes Expressionsmuster zeigte, als die GFP-CHD im Versuch zuvor (siehe Abbildung 56B). Das GFP-IN-CHD-Konstrukt schien exprimiert zu werden und wurde dank der NLS erfolgreich in den Zellkern transportiert. Man konnte sehen, dass das Protein an der Zellkernperipherie, an mindestens drei Punkten akkumulierte. Basierend auf den elektronenmikroskopischen Beobachtungen von Kaller *et al.* 2006 kann es sich hierbei um elektronendichtes Material, sogenannte *nuclear caps*, oder auch Nukleoli handeln. Da es sich bei diesen Bereichen um

aktive rDNA-Abschnitte handelt, und da mit der Überlagerung der Bilder, in denen die Expression des HcpA-mRFPmars zu sehen ist, keine Kolo­kalisierung am Heterochromatin beobachtet werden konnte, musste davon ausgegangen werden, dass auch die verlängerte Chromodomäne keine Interaktion mit heterochromatischen Bereichen einging.

Trotzdem wurde nochmals eine Interaktionsanalyse mit dem kompletten Skip­per-1-Element aus *D. discoideum* durchgeführt. Dieses Element wurde von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Christian Hammann von der Jacobs University in Bremen generiert. Es handelt sich dabei um das komplette Skip­per-1-Element, welches in das Plasmid pDM304 kloniert wurde und ein GFP-Tag am N-Terminus besitzt. Sowohl HcpA-mRFPmars, als auch das pDM304-GFP-Skip­per-1-Plasmid wurden durch Doppeltransformation in den AX2-Stamm gebracht. Da beide Plasmide eine G418-Resistenz besaßen wurden die Zellen unter dieser Selektion kultiviert. Es wurden danach sowohl lebende, als auch fixierte Zellen mikroskopiert.

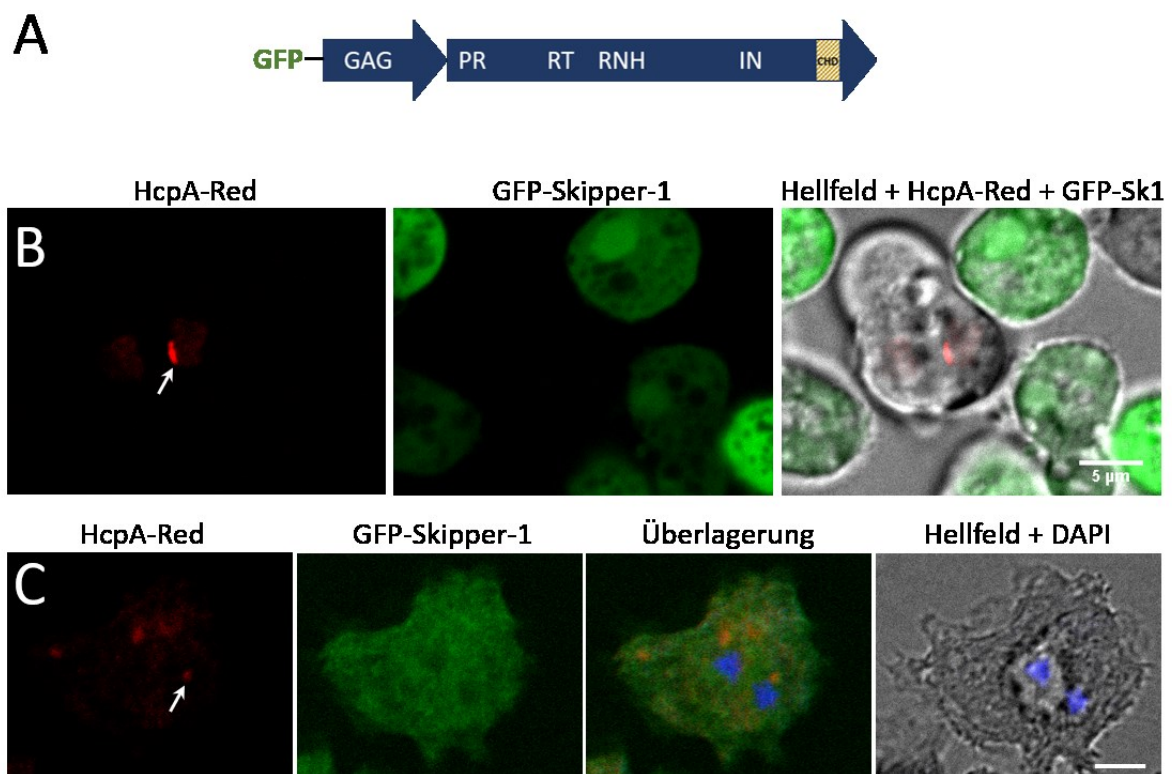


Abbildung 57: Expression von GFP-Skipper-1 und HcpA-mRFPmars in AX2

A: Schematische Darstellung des GFP-Skipper-1-Elements. **B** und **C:** Fluoreszenzaufnahmen von AX2-Zellen, welche HcpA-mRFPmars und GFP-Skipper-1 exprimieren. Die in **B** abgebildeten Zellen wurden lebend mikroskopiert. Die in **C** abgebildeten Zellen wurden fixiert. Überlagerung zeigt exprimiertes HcpA-Red, GFP-Sk1 (= Skipper-1) und DAPI um den Zellkern zu lokalisieren. Beide Größenbalken zeigen 5 µm an.

Vergleicht man die Expression des HcpA-mRFPmars-Proteins in Abbildung 57 (B mit C), dann sieht man deutlich, dass das Fluoreszenz-Signal in lebenden Zellen kräftiger erscheint. Es lässt sich wieder der typische rote Punkt an der Peripherie des Zellkerns erkennen. Die Expression des GFP-Skipper-1-Elements im Gegensatz dazu war willkürlich im Cytosol verteilt und es war zu vermuten, dass es sich dabei um eine Überexpression handelte. Somit ließ sich auch in diesem Experiment keine eindeutige Aussage über eine mögliche Kolokalisation der beiden Proteine an Heterochromatin beobachten.

4 Diskussion

4.1 DGLT-A benötigt für die zielgerichtete Integration Tfc4 aus dem TFIIIC-Komplex

Es ist eine Vielzahl von Retrotransposons und Retroviren bekannt, die nicht willkürlich im Genom integrieren, sondern zielgerichtet über die Interaktion ihrer eigenen Proteine und denen des Wirtes. So interagiert der C-terminale Teil des LEDGF (*epithelium-derived growth factor*) mit der Integrase des HIV-1-Retrovirus und lenkt diesen in transkriptionsaktive Bereiche (Cherepanov *et al.* 2005, Cherepanov *et al.* 2003, Craigie und Bushman 2012, Maertens *et al.* 2003). Tf1 aus *Schizosaccharomyces pombe*, dessen Integrationsziele POLII-Promotoren sind, interagiert während der Replikation über die eigene Integrase mit dem DNA-bindenden-Protein Sap1 (Jacobs *et al.* 2015, Leem *et al.* 2008). Es wurde beobachtet, dass das Retrotransposon Ty1 aus *S. cerevisiae* vor tRNA-Gene springt, indem es mit Untereinheiten der RNA-Polymerase III interagiert (Bridier-Nahmias *et al.* 2015, Cheung *et al.* 2016). Ty3 integriert ebenfalls vor tRNA-Genen. Dabei interagiert die Integrase des LTR-Retrotransposons mit Transkriptionsfaktoren der RNA-Polymerase III, was einen anderen Mechanismus zur Identifikation von Integrationszielen erkennen lässt als bei Ty1 (Lesage und Todeschini 2005). Die Integrase von Ty3 interagiert mit dem TFIIIB-Komplex, bzw. dessen Untereinheiten TBP und Brf1 und der Untereinheit Tfc1 des TFIIIC-Komplexes (Aye *et al.* 2001, Qi und Sandmeyer 2012, Rozenfeld und Thuriaux 2001, Yieh *et al.* 2000).

Das LTR-Retrotransposon Ty3 aus *S. cerevisiae* und DGLT-A aus *D. discoideum* zeigen die gleiche Integrationspräferenz. Beide LTR-Retrotransposons integrieren ca. 15 bp vor tRNA-Gene. Trotz der evolutionären Distanz beider Elemente konnte daher vermutet werden, dass die beiden LTR-Retrotransposons den gleichen molekularen Mechanismus für die Identifikation des Integrationsortes verwenden. In dieser Arbeit wurde jedoch festgestellt, dass DGLT-A deutlich andere Proteininteraktionen mit dem POLIII-Präinitiationskomplex zeigt, als Ty3. Interaktionsanalysen mittels des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems zeigten, dass die Proteine von DGLT-A weder Interaktionen zwischen dem TFIIIB-(TBP oder Brf1)-Komplex noch zwischen der Untereinheit Tfc1 aus dem TFIIIC-Komplex eingingen. Innerhalb der Grenzen negativer Ergebnisse über das Hefe-Zwei-Hybrid-System, konnten somit die Interaktionspartner, mit denen Ty3 zielgerichtet integriert, ausgeschlossen werden. Stattdessen wurden noch nicht zuvor beschriebene Interaktionen zwischen dem TFIIIC-Komplex und Proteinen von DGLT-A

identifiziert. So werden offensichtlich die beiden DGLT-A Proteine Integrase und RNH benötigt, um eine Interaktion mit der Untereinheit Tfc4 aus dem TFIIIC-Komplex eingehen zu können und damit das Retrotransposon zielgerichtet ca. 15 bp vor tRNA-Gene integrieren zu lassen (siehe Abbildung 58).

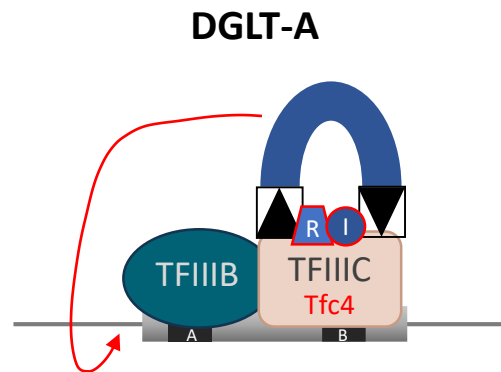


Abbildung 58: Gefundene Proteininteraktion zwischen RNH, Integrase und Tfc4 in *D. discoideum* für die zielgerichtete Integration von DGLT-A

Schematische Darstellung der gefundenen Interaktionspartner für die zielgerichtete Integration von DGLT-A vor tRNA-Gene. Das „Interaktionsdreieck“ besteht aus dem Transkriptionsfaktor Tfc4 (rot) im TFIIIC-Komplex, der RNA-Polymerase III und den Proteinen der DGLT-A-Domänen RNH (R) und Integrase (I) (blau mit roter Einfassung).

4.1.1 Tfc4 als Hotspot für Proteininteraktionen

Nach der Anfertigung des Strukturmodells von Tfc4 aus *D. discoideum*, das auf der von Male *et al.* 2015 veröffentlichten Kristallstruktur des *S. cerevisiae*-Tfc4 beruht, konnte festgestellt werden, dass die TPRs 1-10 aus *D. discoideum* eine ähnliche räumliche Struktur einnehmen, wie die des *S. cerevisiae*-Tfc4. Orientiert an dem *D. discoideum*-Strukturmodell wurden in dieser Arbeit Interaktionsversuche mittels des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems durchgeführt, mit denen die Interaktionsfläche des Tfc4 (TPRs 1-10), welches für die spezifische Integration von DGLT-A verantwortlich ist, eingegrenzt werden konnte. So wurde herausgefunden, dass nur die TPRs 7-10 mit den Proteinen RNH und Integrase von DGLT-A interagieren.

Untersuchungen an *S. cerevisiae* zeigten, dass die Untereinheit Tfc4 durch ihre TPR-Array Anordnung und ihre hohe Flexibilität ein Bindungshotspot im Präinitiationskomplex der RNA-Polymerase III ist (Male *et al.* 2015). Beispielsweise hilft Tfc4 durch die Interaktion mit Tfc3 bei der Zusammenführung der TFIIIC-Subkomplexe τA und τB (Male *et al.* 2015). Eine Bindung von Tfc4 mit den Untereinheiten der RNA-Polymerase III, Rpc53 und ABC10 α , konnte

ebenso beobachtet werden (Dumay *et al.* 1999, Wu *et al.* 2011). Ebenfalls interagiert Tfc4 schrittweise mit den Untereinheiten Brf1 und Bdp1 und hilft somit TFIIIB an tRNA-Gene zu binden (Dumay-Odelot *et al.* 2002, Liao *et al.* 2003).

Aus Interaktionsstudien mit Tfc4 aus der Hefe *S. cerevisiae* ist bekannt, dass Brf1 unabhängig an beide TPR-Arme des Tfc4 binden kann, dieses jedoch eine höhere Affinität zu den TPRs 7-10 hat als zu dem TPR-Array 1-5. Es wurde beobachtet, dass die Affinität von Brf1 zu dem TPR-Array 1-5 steigt, wenn Aminosäuren am N-Terminus anwesend sind (Moir *et al.* 2002). Dies lässt vermuten, dass die initiale Bindung von Brf1 über den TFIIIC-DNA-Komplex am TPR-Array 7-10 stattfindet, es dadurch zur Konformationsänderung von Tfc4 kommt und deshalb eine Verbindung von Brf1 mit dem TPR-Array 1-5 eingegangen werden kann. Somit stehen die TPRs 7-10 für den nachfolgenden Bindungspartner Bdp1 wieder zur Verfügung (Ishiguro *et al.* 2002, Liao *et al.* 2003, Moir *et al.* 2002, Rozenfeld und Thuriaux 2001). Wie wichtig Tfc4 für den Präinitiationskomplex ist, wurde durch Untersuchungen an Hefe-Tfc4 festgestellt. Dabei führten Mutationen im DL-Motiv des TPR 8 (D468 und L469) dazu, dass die Bindungsaffinität für die beiden Untereinheiten Brf1 und Bdp1 abnahm und die Bindung von Tfc3, und somit die Formation des τ A/ τ B-Komplexes, komplett unterbunden wurde.

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Interaktionsstudien zwischen Tfc4, IN-NTD und RNH von *D. discoideum* wurde durch die Eingrenzung der TPR-Interaktionsflächen beobachtet, dass auch bei *D. discoideum* sowohl TPR 7 als auch TPR 8 in die Interaktion mit den DGLT-A-Proteinen involviert sind und dass beide TPRs als Oberfläche ausreichen um sowohl die Integrase (IN-NTD) als auch RNH zu binden. Interessanterweise konnte auch in beiden A-Helices der TPRs das konservierte DL-Motiv gefunden werden, welches in den Untersuchungen von Male *et al.* 2015 mutiert wurde. Male *et al.* 2015 vermuten, dass die Art und Weise der Ausrichtung dieser Aminosäuren eine Plattform für Proteininteraktionen bietet. So wird postuliert, dass Leucin 469 (L469) so ausgerichtet ist, dass es in die Richtung des benachbarten TPR 7 zeigt. Im Gegensatz zur Asparaginsäure (D) an Position 468, welche die Helixstruktur von TPR 8 abdeckt und somit eine Fläche zur Proteininteraktion bietet. Durch die Erstellung des Strukturmodells der TPRs 1-10 aus *D. discoideum* wurde festgestellt, dass die Orientierung des DL-Motivs aus *D. discoideum* dem der Hefe ähnelt. Sowohl L448 aus TPR 7 als auch L487 aus TPR 8 orientieren sich zur nächstgelegenen Helix, während D447 aus TPR 7 und D486 aus TPR 8 die eigene Helixstruktur verstärken (siehe Abbildung 59). Dies lässt vermuten, dass beide TPRs wichtig für das Zusammenführen des Präinitiationskomplexes der

RNA-Polymerase III sind und dass beide TPRs Flächen für Proteininteraktionen zur Verfügung stellen können.

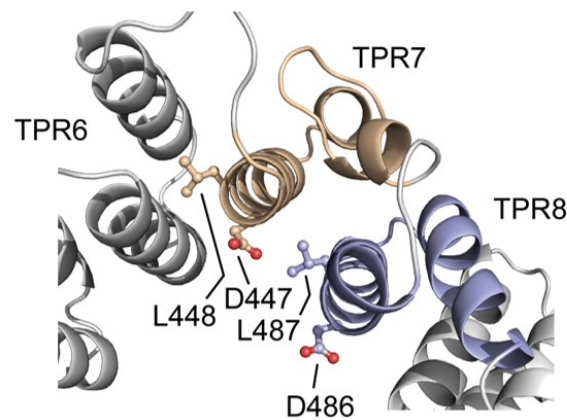


Abbildung 59: Strukturmodell der TPRs 7 und 8 aus Tfc4 von *D. discoideum* mit DL-Motiv

Darstellung von TPR 7 (hellbraun) und TPR 8 (hellblau) aus Tfc4 von *D. discoideum*. Als Kugel-Stab-Modell sind die konservierten Aminosäuren Asparaginsäure (D) und Leucin (L) gekennzeichnet, welche sich unterschiedlich im Raum ausrichten.

Durch die Ergebnisse der Hefe-Zwei-Hybrid-Versuche kann man zudem annehmen, dass die DL-Motive in TPR 7 und TPR 8 dafür verantwortlich sind, dass RNH beide TPRs unabhängig voneinander binden kann, indem die Ausrichtung der Aminosäuren eine jeweilige Interaktionsfläche für diese bereitstellt. Dies steht im Gegensatz zur Integrase (IN-NTD), welche zusätzlich die Schnittstellen zwischen TPR 7 und TPR 8 benötigt. Zudem zeigten vorläufige Interaktionsstudien mit mutiertem DL-Motiv in den beiden TPRs des Tfc4 von *D. discoideum*, dass durch den Austausch der Aminosäure Asparaginsäure (D447) zu Lysin (K) sowohl die Interaktion mit RNH als auch mit der Integrase unterbunden wurde (siehe Abbildung 40), was die Hypothese, dass das konservierte DL-Motiv als wichtige Interaktionsfläche dient, zusätzlich unterstützt.

4.1.2 Die Rolle der RNH während der Retrotransposition

Durch die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse kann vermutet werden, dass die RNH des LTR-Retrotransposons DGLT-A, neben dem Abbau der RNA im DNA-RNA-Hybrid während der DNA-Synthese des Zweitstrangs, eine weitere wichtige Rolle einnimmt. Es wurde festgestellt, dass DGLT-A-RNH eine robuste Interaktion mit dem N-terminalen Teil der Integrase (IN-NED) eingeht und dass diese Interaktion möglicherweise erforderlich für die zielgerichtete Integration des Retrotransposons ist.

Aus anderen Arbeiten ist bekannt, dass die Interaktion zwischen der RT-RNH-Domäne und der Integrase während der Amplifikation von Retrotransposons und Retroviren von sehr großer Bedeutung ist. So interagiert beispielsweise die Reverse Transkriptase aus HIV-1 mit dessen Integrase-Domäne. Dadurch wird die katalytische Aktivität der Integrase inhibiert und es wird sichergestellt, dass die Virus-cDNA nicht zu früh in das Genom des Wirtes integriert (Hehl *et al.* 2004, Oz *et al.* 2002, Tasara *et al.* 2001). Ein weiteres Beispiel ist die RNH-IN-Interaktion des Retrotransposons Tf1 aus *Schizosaccharomyces pombe*. Während der Retrotransposition interagiert hier die Integrase mit der RT, um nach der reversen Transkription die RNA-Primer an der cDNA zu entfernen (Herzig *et al.* 2012). Zudem konnten die Arbeiten über Hefe-Zwei-Hybrid-Experimente zeigen, dass auch die Tf1-RNH mit der Integrase interagiert. Allerdings ist hier die katalytische Kerndomäne (CCD) der Integrase und nicht IN-NTD, wie bei DGLT-A, an der Interaktion mit der RNH beteiligt (Steele und Levin 1998).

Da die RNH Teil des RT-RNH-Komplexes ist, stellte sich während der Untersuchungen die Frage, wann und inwiefern die RNH von DGLT-A als Interaktionsfläche dienen kann. Betrachtet man die von Nowak *et al.* 2014 veröffentlichte Kristallstruktur des RT-RNH-Komplexes aus Ty3, so wird postuliert, dass diese in Anwesenheit eines DNA-RNA-Hybrides Dimere bildet. Die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse zeigten eine mögliche Dimerisierung über die RNH von DGLT-A. Dass diese jedoch die treibende Kraft dafür ist, dass komplette RT-RNH-Komplexe während der Retrotransposition von DGLT-A Dimere bilden, ist jedoch schwer vorstellbar, denn vergleichend mit der gelösten Kristallstruktur von Ty3 lässt sich erkennen, dass die RNH im RT-RNH-Komplex bei einer möglichen Dimerisierung nicht in Kontakt miteinander stehen, sondern sogar voneinander weg zeigen (siehe Abbildung 60).

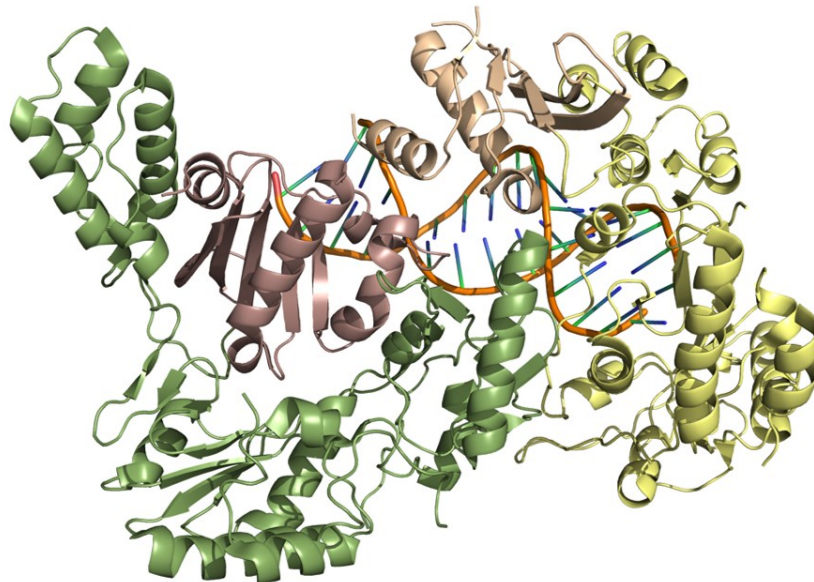


Abbildung 60: Strukturmodell eines RT-RNH-Dimers aus Ty3 inklusive RNA-DNA-Hybrid

Dargestellt ist das Strukturmodell einer Dimerisierung der RT-RNH-Komplexe aus Ty3 mit RNA-DNA-Hybrid als Substrat. Die beiden RT-RNH-Komplexe sind mit unterschiedlichen Farben gekennzeichnet. Die einer rechten Hand ähnelnden Domänen der DNA-Polymerase mit den Bereichen „Handfläche“ (*palm*) „Finger“ (*fingers*) und „Daumen“ (*thumb*) sind grün bzw. gelb dargestellt. Farblich davon abgehoben sind die jeweiligen RNH-Domänen, welche hellbraun und dunkelbraun erscheinen. Speziell die Kernbereiche mit den β -Faltblättern zeigen im Strukturmodell deutlich voneinander weg, und tragen wahrscheinlich nicht zur RT-RNH-Dimerisierung bei. Das Strukturmodell wurde mit SWISS-MODEL erstellt und basiert auf den Kenntnissen der RT-RNH-Struktur von Ty3 aus Nowak *et al.* 2014 (PDB 4OL8).

Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die DGLT-A-RNH Interaktionen eingehen kann. So kann man vermuten, dass Teile der RNH während der Retrotransposition von DGLT-A freigelegt werden und diese dann als Interaktionsfläche mit anderen Komplexen dient. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, ist zu vermuten, dass eine Interaktion mit dem vorderen Teil der Integrase (IN-NED) eingegangen werden kann, ebenso aber auch eine Interaktion mit einem RT-RNH-Komplex möglich ist. Jedoch könnte dabei die Interaktion mehr zur Stabilisierung des möglichen Dimers beitragen, als zur aktiven Bildung und Bindung dessen.

Weiterhin konnte gesehen werden, dass die DGLT-A-RNH eine robuste Bindung mit Tfc4 eingeht. Diese Ergebnisse legen nahe, dass der RT-RNH-Komplex ein Bestandteil des Präintegrationskomplexes von DGLT-A ist. Besonders gut dokumentiert ist die Rolle des RT-RNH-Komplexes während der Präintegration von HIV-1 (Miller *et al.* 1997). Hier wird davon ausgegangen, dass neben dem Umschreiben des RNA-Intermediats in cDNA der

RT-RNH-Komplex zudem weiterhin als Bestandteil des Präinitiationskomplexes dient, da dieser zusätzlich daran beteiligt ist den Verdau der cDNA zu verhindern. Es ist zwar schwer vorstellbar, dass der RT-RNH-Komplex nach dem Prozess der reversen Transkription in Retrotransposons und Retroviren weiterhin noch zwingend anwesend sein muss, jedoch dient dieser möglicherweise bei der Verdichtung und dem Schutz der synthetisierten cDNA, sowie der Stabilisation des Protein-DNA-Komplexes, dem sogenannten Intasom (Krishnan *et al.* 2010, Miller *et al.* 1997). Zudem muss berücksichtigt werden, dass nicht nur die Domänen der Retrotransposons selbst am Präintegrationskomplex beteiligt sind, sondern dass ebenso verschiedene Wirtsproteine an der Integration von mobilen Elementen mitwirken und somit ihren Beitrag zum Intasom leisten (Sultana *et al.* 2017).

4.1.3 Die Rolle der Integrase während der Retrotransposition

Zudem stellt sich die Frage, wie die Integrase von DGLT-A während der Retrotransposition mit dem RT-RNH-Komplex interagiert. Aus den Untersuchungen von Kirchner und Sandmeyer (1993) geht hervor, dass das Polyprotein von Ty3 proteolytisch prozessiert wird, um eine Transposition zu gewährleisten. Dabei wird auch der RT-RNH-Komplex von der Integrase getrennt. Da die Ty3-Integrase jedoch während der Retrotransposition von großer Bedeutung ist - ist sie doch für die Initiation der reversen Transkription und die anschließende Stabilisierung der cDNA und des Präintegrationskomplexes verantwortlich (Kirchner und Sandmeyer 1996, Nymark-McMahon *et al.* 2002, Nymark-McMahon und Sandmeyer 1999) - ist es wahrscheinlich, dass auch eine weitere, nicht-kovalente Bindung der Integrase am RT-RNH-Komplex existiert. Die für die proteolytische Prozessierung benötigten Spaltstellen im Polyprotein von Ty3 konnten identifiziert werden (Kirchner und Sandmeyer 1993), wohingegen die Spaltstellen-Motive in DGLT-A, bisher noch nicht gefunden wurden. Trotzdem ist anzunehmen, dass auch die DGLT-A-Integrase als separates Protein agiert, welches jedoch noch in Kontakt mit RT-RNH steht, denn die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigten eine robuste Interaktion zwischen der Integrase, besonders deren erweiterten N-terminalen Domäne, und der RNH.

Dass zusätzliche Protein-Protein-Interaktionen auch innerhalb der Integrase, speziell der N-terminalen Domäne von DGLT-A, festgestellt wurden, passt in diese Modellvorstellung. So zeigten mehrere Arbeiten, dass beispielsweise die Integrase des Retrovirus HIV-1 als Multimer, mindestens aber als Dimer, vorliegen muss, um aktiv sein zu können (Engelman *et al.* 1993, Jones *et al.* 1992, van Gent *et al.* 1993), und dass speziell eine Dimerisierung sowohl

der N-terminalen Domäne (NTD) als auch der katalytischen Kerndomäne (CCD) die Voraussetzung für ein funktionsfähiges Protein ist (Wang *et al.* 2001). Es ist somit festzuhalten, dass wahrscheinlich sowohl die RNH, als auch die Integrase eine wichtige Rolle bei der Retrotransposition von DGLT-A spielen.

4.2 DGLT-A und Ty3 finden das gleiche Integrationsziel über unterschiedliche molekulare Mechanismen

Sowohl Ty3 als auch DGLT-A finden in dem haploiden, kompakten Genom der Hefe bzw. von *D. discoideum* spezifische intergenische Bereiche, in die sie integrieren. Beide LTR-Retrotransposons entwickelten dafür eine Strategie, nämlich die der zielgerichteten Integration vor tRNA-Gene. Die Vermutung, dass beide Retrotransposons dies über die gleiche Art und Weise tun, konnte mit den Ergebnissen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Beide Retrotransposons finden jedoch tRNA-Gene während der Initiation der Transkription mittels des Präinitiationskomplexes der RNA-Polymerase III. Dabei bindet Tfc3 aus dem τ B-Komplex die B-Box im tRNA-Gen und die Assemblierung von TFIIIC (τ A/ τ B-Komplex) wird komplettiert. Der an der DNA gebundene τ A-Komplex vermittelt daraufhin die Bindung des TFIIIB-Komplexes, indem die Untereinheit Tfc4 mit der TFIIIB-Untereinheit Brf1 interagiert. Das TATA-Box-Bindeprotein (TBP) wird dabei in den TFIIIB eingebaut, indem es eine Interaktion mit Brf1 eingeht.

Ty3 nutzt seine Integrase um den spezifischen Integrationsort vor tRNA-Genen identifizieren zu können. Dabei interagiert die Integrase direkt mit dem TBP/Brf1-Heterodimer (Lin *et al.* 2001, Yieh *et al.* 2000), welches zum TFIIIB-Komplex des zur Initiation der Transkription aufgebauten Präinitiationskomplexes der RNA-Polymerase III gehört. Die Interaktion findet am 5'-Ende der tRNA-Gene statt, an denen Ty3 ca. 15 bp davor integriert. Eine spezielle Interaktion zwischen dem erweiterten Integrase-Teil (IN-NED) und der Untereinheit Tfc1 aus TFIIIC wird hingegen eingegangen, um das Retrotransposon in gleicher Orientierung zur Transkriptionsrichtung wie die des Ziel-tRNA-Gens einzufügen (Aye *et al.* 2001, Qi und Sandmeyer 2012, Yieh *et al.* 2000) (siehe Abbildung 61). Weiterhin ist noch nicht bekannt, ob auch die RT-RNH-Domäne von Ty3 eine Rolle bei der Integration spielt. Das Intasom von Ty3 besteht also nach jetzigem Kenntnisstand aus cDNA und Integrase, welche mit den oben beschriebenen Proteinen interagiert, um positionsspezifisch vor tRNA-Gene zu integrieren.

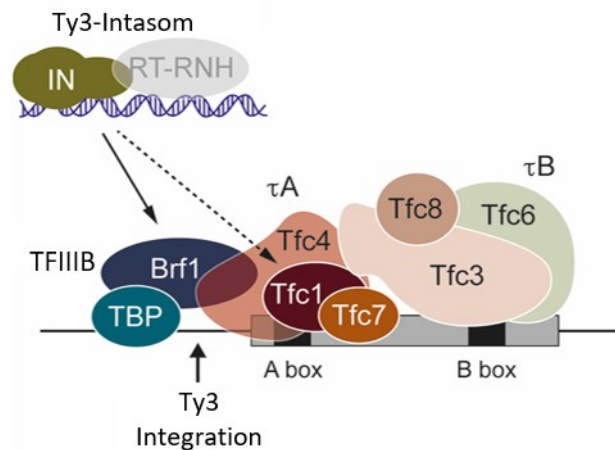


Abbildung 61: Modell zur zielgerichteten Integration von Ty3

Dargestellt ist die Interaktion zwischen dem Ty3-Intasom und dem Präinitiationskomplex der POLIII an tRNA-Genen. Das Ty3-Intasom besteht aus Integrase und cDNA. Dass die RT-RNH-Domäne zusätzlich eine Rolle bei der Integration spielt ist bisher noch nicht bewiesen.

Nach den in dieser Arbeit erlangten Ergebnissen interagiert DGLT-A weder mit einer Untereinheit des TFIIB-Komplexes noch mit Tfc1, sondern zeigt nur Interaktionen mit der TFIIC-Untereinheit Tfc4. Wie zuvor beschrieben zeigten Untersuchungen, dass Tfc4 ein regelrechter Bindungshotspot ist. Es stellt sich daher die Frage, wann dem DGLT-A-Intasom Zugang zu dem Präinitiationskomplex der RNA-Polymerase III, genauer gesagt dem Bindungshotspot Tfc4, ermöglicht wird, um eine Interaktion mit diesem eingehen zu können und dadurch zielgerichtet vor tRNA-Gene zu integrieren. Man kann die Hypothese formulieren, dass das DGLT-A-Intasom den Zugang zur Tfc4-Untereinheit nutzt, nachdem die DNA-Bindung des TFIIB-Komplexes mit seinen Untereinheiten TBP und Brf1 stattgefunden hat. Brf1 interagiert zu diesem Zeitpunkt mit dem linken Arm (TPRs 1-5) der Tfc4-Untereinheit, was eine andere Interaktion über die TPRs 7-10 ermöglicht. Bdp1 kann somit vorübergehend an Tfc4-TPR 8 binden und verdrängt dadurch den durch Tfc3 verbundenen τB-Komplex. Man kann spekulieren, dass während dieser Umstrukturierung des TFIIC-Komplexes es zu einer Konkurrenz zwischen dem DGLT-A-Intasom und Bdp1 oder dem τB-Komplex an τA, speziell der Tfc4-TPR 8-Interaktionsfläche, kommt (siehe Abbildung 62).

Bei einer erfolgreichen Interaktion mit Tfc4-TPR 7/8 würde DGLT-A somit Zugang zu genomischer DNA erhalten und könnte spezifisch vor tRNA-Gene integrieren.

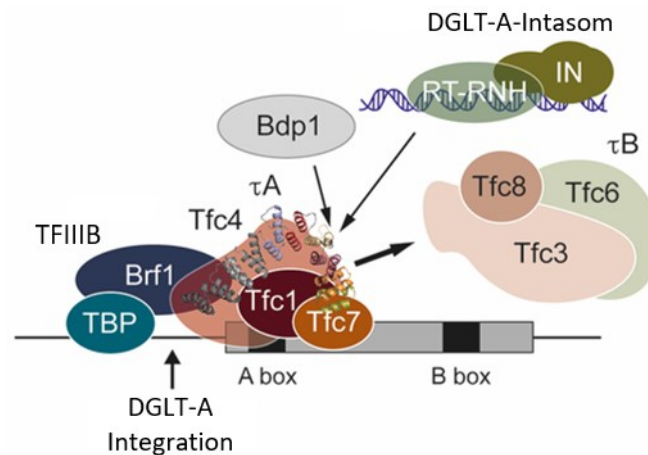


Abbildung 62: Modell zur zielgerichteten Integration von DGLT-A

Dargestellt ist die Interaktion zwischen dem Intasom von DGLT-A und dem Präinitiationskomplex der POLIII an tRNA-Genen. Besonders Bdp1, DGLT-A-Intasom und τ B-Komplex konkurrieren dabei um die Bindung an Tfc4.

Die LTR-Retrotransposons Ty3 und DGLT-A gehören beide zu der Ty3/gypsy-Gruppe und besitzen somit die gleichen Wurzeln, was man an der Ähnlichkeit in ihrem strukturellen Aufbau und der Homologie ihrer Polyproteine erkennt. Auch die Kerndomänen RT-RNH und Integrase können trotz der evolutionären Distanz beider Elemente strukturell miteinander verglichen werden. Dass beide Elemente zudem an die gleiche Stelle im Genom integrieren, nämlich jeweils ca. 15 bp vor tRNA-Gene, könnte darauf schließen lassen, dass der molekulare Mechanismus, mit dem sie ihre Ziel-DNA identifizieren auf „divergente Evolution“ zurückzuführen ist. Das würde bedeuten, dass ein gemeinsamer Vorläufer beider Elemente eine tRNA-Gen-Spezifität hatte, die sich in beiden Elementen auf molekularer Ebene unterschiedlich weiterentwickelt hat.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit und den daraus aufgestellten Modellen, die die molekularen Mechanismen zur Identifikation von Integrationszielen der beiden LTR-Retrotransposons beschreiben, kann alternativ vermutet werden, dass es sich bei der Entwicklung der Integrationsspezifität von Ty3 und DGLT-A um „konvergente Evolution“ handelt. In dieser Hypothese haben beide Elemente eine ähnliche Lösung für dasselbe Problem gefunden: die Identifikation von tRNA-Genen als sichere Integrationsorte in kompakten, haploiden Genomen. Beide Elemente integrieren an ähnlichen Positionen vor tRNA-Genen und interagieren mit dem Präinitiationskomplex der RNA-Polymerase III. Sie unterscheiden sich aber durch ihre Interaktionspartner und somit vermutlich auch in der

zeitlichen Abfolge der Interferenz des Präintegrationskomplexes mit der PolIII-Transkription.

Weiterhin würde für die Theorie der „konvergenten Evolution“ der Erkennung von Integrationszielen durch DGLT-A und Ty3 sprechen, dass innerhalb der gesamten Elemente der Ty3/gypsy-Gruppe, welche man in unterschiedlichsten Organismen mit unterschiedlichen Integrationsspezifitäten findet (Miller *et al.* 1999, Xiong und Eickbush 1990), die zielgerichtete Integration ca. 15 bp vor tRNA-Gene bisher nur in *S. cerevisiae* und *D. discoideum* beobachtet wurde. Es stellt sich somit die Frage, ob alle anderen Elemente diese Integrationsspezifität eines potentiellen gemeinsamen Vorläufers verloren haben, oder, was wahrscheinlicher ist, eine zweimalige unabhängige Entwicklung der molekularen Mechanismen zur Identifikation von Integrationszielen stattgefunden hat.

4.3 Amplifikation und Integration des artifiziellen Retrotransposons

DGLT-A^{bsr}

In dieser Arbeit ist es gelungen ein genetisch markiertes, artifizielles DGLT-A-Element zu generieren, mit dem man *in vivo* dessen Integration im Genom von *D. discoideum* untersuchen kann. Da alle DGLT-A-Elemente im Genom von *D. discoideum* unvollständig sind (Glöckner *et al.* 2001), wurde der bioinformatische Konsensus der gefundenen Elemente für die Generierung des artifiziiellen Elements verwendet. Durch die Sequenzanalyse der Blasticidin-Resistenzkassette nach der Durchführung des Retrotranspositionstests konnte eindeutig gezeigt werden, dass der bioinformatische Konsensus des DGLT-A-Elements tatsächlich ein retrotranspositions kompetentes Element repräsentiert und DGLT-A^{bsr} mobilisiert wurde. Denn nur durch das Herausspleißen des artifiziiellen Introns aus der Plusstrang-RNA der Blasticidin-Resistenzkassette des DGLT-A^{bsr}-Elements, können die Elemente innerhalb des Genoms durch Retrotransposition amplifiziert werden und die Zellen eine Blasticidin-Resistenz aufbauen. Trotz erfolgreicher Mobilisierung wurde während der Durchführung der Methode beobachtet, dass kaum Blasticidin-resistente Klone entstanden, was durch parallele Versuche mit dem Skipper-1^{bsr}-Element, dessen Mobilisierung im Vergleich fast das Zehnfache an Klonen hervorbrachte, noch mehr verdeutlicht werden konnte. Für die Analyse von Integrationen der artifiziiellen Elemente innerhalb des *D. discoideum*-Genoms werden jedoch eine Vielzahl von Blasticidin-resistenten Klonen, welche vollzogene Sprungereignisse der artifiziiellen Elemente repräsentieren, benötigt. Zur Integrationsanalyse des artifiziiellen Non-LTR-Retrotransposons TRE5-A konnten Siol *et al.* ca. 430 Blasticidin-resistente Klone pro 1×10^7 -Zellen nutzen (Siol *et al.* 2011). Dass das TRE5-A^{bsr}-Element mehr Sprungereignisse hervorbringt als die beiden artifiziiellen LTR-Retrotransposons liegt zum einen vermutlich daran, dass das endogene TRE5-A-Element generell eine wesentlich höhere intrinsische Retrotranspositionsaktivität aufweist als die beiden endogenen LTR-Retrotransposons (Beck *et al.* 2002, Siol *et al.* 2006, Siol *et al.* 2011). So konnten Beck *et al.* und Siol *et al.* mit der sogenannten „TRE-Falle“, die eine tRNA-Gen-gerichtete Retrotransposition in *D. discoideum* erfassen kann, ausschließlich Integrationen von TRE5-A und nie von DGLT-A beobachten. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass auch die Retrotranspositionsfrequenz von Skipper-1^{bsr} und im Speziellen DGLT-A^{bsr} eine höhere ist, als die, die über Blasticidin-resistente Klone sichtbar wird. So zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass das in den beiden artifiziiellen LTR-Retrotransposons, Skipper-1^{bsr} und

DGLT-A^{bsr}, vorhandene Intron der bsrI-Kassette unterschiedlich gut gespleißt wird. Daher ist anzunehmen, dass aus bisher noch nicht bekannten Gründen die Effizienz des Spleißens der *mbsrI*-RNA vom Kontext, der umgebenden DNA-Sequenzen, abhängt. Es kann daher vermutet werden, dass DGLT-A^{bsr} wesentlich aktiver sein könnte als in dem bisher durchgeführten Retrotranspositionstest. Daher ist zu überlegen, wie man das aktive DGLT-A^{bsr}-Element modifizieren könnte, um eine höhere Ausbeute an Blastocidin-resistenten Zellen zu erhalten. In *D. discoideum* existieren 17-20 unterschiedlich stark regulierte Actin-Gene, welche für das gleiche Protein codieren (Knecht *et al.* 1986). Durch Experimente mit den Promotoren der beiden Gene Actin15 (A15) und Actin6 (A6), die an ein Neomycin-Resistenz-Genen fusioniert wurden, und mittels Transformation in die *D. discoideum*-Zellen gebracht wurden, konnte gezeigt werden, dass die Zellen mit dem zusätzlichen A6-Promotor ca. die 200-fache Menge an Neomycin-resistenten Zellen hervorbrachte (Knecht *et al.* 1986). Experimente von Siol *et al.* 2011, in denen das am 5'UTR als schwacher Promotor agierende A-Modul des artifiziellen TRE5-A-Elements mit diesem A6-Promotor ausgetauscht wurde, konnten ebenso zeigen, dass es dadurch zu einer erhöhten Aktivität des TRE5-A^{bsr}-Elements kommt (Siol *et al.* 2011). Bei dem LTR-Retrotransposon DGLT-A^{bsr} wird die Transkription über die eigene 5'-LTR-Promotor-Region reguliert. Es kann somit überlegt werden, ebenfalls die Promotorregion innerhalb des 5'-LTRs von DGLT-A^{bsr} mit dem Promotor des A6-Gens zu ersetzen, um dadurch möglicherweise eine höhere Transkriptionsaktivität des Elements zu erlangen. Da die Versuche in dieser Arbeit jedoch darauf hinweisen, dass durch die Probleme beim Spleiß-Vorgang die Blastocidin-Resistenz nicht vermittelt wird und dass zusätzlich die Möglichkeit besteht, dass nicht-gespleißte und somit experimentell nicht sichtbare DGLT-A^{bsr}-Varianten integrieren, kann zudem überlegt werden, inwiefern die *mbsrI*-Kassette modifiziert werden kann um ein effektiveres Spleißen zu gewährleisten. So könnte man beispielsweise die Codon-Usage des aus dem *Bacillus cereus* stammenden Blastocidin-S-Deaminase-Gens (Sutoh 1993) an die von *D. discoideum* anpassen, oder generell einen anderen codonoptimierten Selektionsmarker im artifiziellen DGLT-A-Element wählen. Beispielsweise könnte, wie auch mit dem artifiziellen TRE5-A-Element getestet, das *bsr*-Gen durch ein Hygromycin-Phosphotransferase-Gen, welches den *D. discoideum*-Zellen Hygromycin B-Resistenz verleiht (Egelhoff *et al.* 1989) ersetzt werden. Außerdem könnte das in der Resistenz-Kassette existierende, aus dem *D. discoideum*-S17-Gen isolierte Intron ausgetauscht werden. Da *D. discoideum*-Gene wenige Introns mit einer durchschnittliche Länge von nur 104 bp besitzen (Ma *et al.* 2015), würde möglicherweise ein anderes, kurzes

Intron zu einem effektiveren Spleiß-Vorgang beitragen. Unter der Voraussetzung, dass es gelingt die Retrotranspositionsaktivität des genetisch markierten DGLT-A-Elements zu erhöhen, könnten daraufhin dessen Integrationsorte innerhalb des *D. discoideum*-Genoms genauer untersucht und charakterisiert werden. Um solche sogenannten *de-novo*-Integrationen innerhalb von Genomen identifizieren zu können, wurden, durch die Entwicklung moderner Sequenzier-Methoden, unterschiedliche experimentelle Verfahren etabliert (Gabriel *et al.* 2009, Roggo *et al.* 2013). Vor allem für das humane Non-LTR-Retrotransposon L1 gibt es mehrere Ansätze (Babushok *et al.* 2006, Badge *et al.* 2003, Ewing und Kazazian 2010). Generell kann man aber bei der Sequenzanalyse von *de-novo*-Integrationen grob zwischen zwei experimentellen Verfahren unterscheiden: so kann von gesamtgenomischer DNA ausgegangen werden, aus der direkt und selektiv Sequenzen von transposablen Elementen und ihren flankierenden Bereichen amplifiziert werden, oder es erfolgt eine Anreicherung der betreffenden Sequenzen durch die Durchführung einer „*linear amplification mediated-PCR*“ (LAM-PCR) (Gabriel *et al.* 2014). Bei beiden möglichen experimentellen Verfahren muss jedoch ein Linker an alle Sequenzfragmente ligiert werden. Verfolgt man eine Sequenzanalyse direkt aus doppelsträngiger, genomischer DNA, so bedarf es für die Ligation eines Linkers an Restriktionsschnittstellen im Genom, im Gegensatz zu der Methode der LAM-PCR. Durch vorherige Arbeiten an TRE5-A konnte gezeigt werden, dass durch den hohen AT-Gehalt im Genom von *D. discoideum* (Eichinger *et al.* 2005), vor allem in intergenischen Bereichen und somit auch vor tRNA-Genen, und durch die mögliche Kreuzhybridisierung der redundanten tRNA-Gene im *D. discoideum*-Genom, eine Anreicherung durch LAM-PCR zur Detektion von Integrationsereignissen die Methode der Wahl darstellt (Spaller 2015). Um mit der etablierten Methode durch TRE5-A^{bsr} auch *de-novo*-Integrationen von DGLT-A^{bsr} identifizieren zu können, müsste nach der Durchführung des Retrotranspositionstests mit DGLT-A^{bsr} eine LAM-PCR an genomischer DNA von Blasticidin-resistenten Klonen durchgeführt werden. Da bei der LAM-PCR DNA-Produkte erzeugt werden, die, entgegen der konventionellen PCR, einzelsträngig sind, wird nur ein Primer für die PCR-Reaktion eingesetzt. Eine exponentielle Vervielfältigung der DNA ist demnach nicht möglich, weshalb die Menge der Zyklen erhöht werden muss. Als einzigen Primer könnte bei diesem Versuch ein 5'-biotinyliertes Oligonukleotid verwendet werden, welches innerhalb der Blasticidin-Resistenzkassette, überlappend über der Position des gespleißten Introns, hybridisiert. Die Wahl der Position des Primers, müsste damit gewährleisten, dass nur mobilisierte, artifizielle Elemente mit herausgespleißtem Intron

amplifiziert werden (siehe Abbildung 63). Danach könnte eine Anreicherung der DGLT-A^{bsr}-Elemente erfolgen, indem die biotinolierten DNA-Fragmente an magnetische Streptavidin-Beads gekoppelt und durch einige Waschschrte von ungewünschter, genomischer DNA befreit werden. Somit sollten nur noch mobilisierte DGLT-A^{bsr}-Elemente inklusive ihrer flankierenden Region an den Streptavidin-Beads gebunden sein, welche danach genauer untersucht werden könnten. So könnte man die amplifizierten Produkte aus konventionellen PCRs mit verschiedenen tRNA-spezifischen Primern (reverse) und einem Element-spezifischen Primer sequenzieren lassen, um festzustellen, wohin das artifizielle Element integriert, bevor danach ein Genomweites-DGLT-A^{bsr}-Mapping durchgeführt wird.

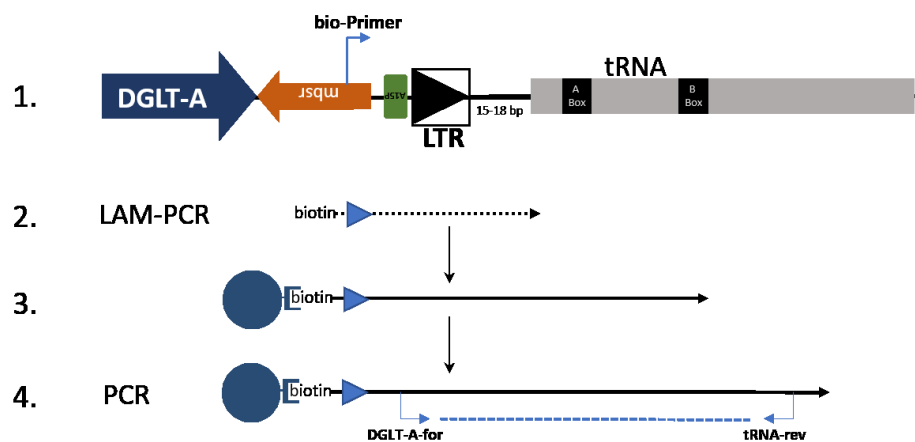


Abbildung 63: Schematische Darstellung der Anreicherung von DGLT-A^{bsr}

Schematische, reduzierte Abbildung des DGLT-A^{bsr}-Elements inklusive Integrationsort im Genom von *D. discoideum* - 15-18 bp vor tRNA Genen - (Nr. 1). bio-Primer: zeigt die Bindungsstelle des mit Biotin gekoppelten Primers, welche sich kurz vor dem Intron innerhalb der Blastizidin-Resistenzkassette befindet. Dadurch wird eine einzelsträngige DNA synthetisiert, die mit Biotin markiert ist (Nr. 2). Diese wird an Streptavidin-Beads gebunden (Nr. 3). Anschließend erfolgt eine konventionelle PCR mit einem Element-spezifischen Primer und einem tRNA-Primer an der angereicherten DNA (Nr. 4).

Nach der Bestätigung darüber, dass DGLT-A^{bsr} nicht nur mobilisiert wird, sondern auch tRNA-Gen-spezifisch integriert, könnte man sich weitere *in vivo*-Interaktionsstudien überlegen, um die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse über den von DGLT-A entwickelten molekularen Mechanismus zur Identifikation von Integrationszielen zu verifizieren. So könnte man in Hefe-Zwei-Hybrid-Vorversuchen gezielte Mutationen in RNH und Integrase einbringen und gegen Tfc4 (TPR7-10) testen. Nachdem eine entsprechende Mutation gefunden wurde, könnte man diese in ein artifizielles DGLT-A-Element einbringen, um durch Sequenzanalysen festzustellen, ob durch die fehlende Interaktion zwischen dem Element und Tfc4 eine gezielte Integration vor tRNA-Gene ausbleibt.

4.4 Die Chromodomäne von Skipper

Die zielgerichtete Integration der mobilen Elemente im Genom von *D. discoideum* findet nicht nur an den 418 tRNA-Genen statt. Genomanalysen zeigten, dass die Mehrheit der mobilen Elemente im *D. discoideum*-Genom Cluster bilden, in die die Transposons wieder favorisiert integrieren. Das prominenteste Beispiel für solch einen komplexen Integrationsort sind die Centromere, welche bei *D. discoideum* aus bis zu 86 % an repetitiven Elementen bestehen (Glöckner und Heidel 2009). So bestehen diese Bereiche zu ca. 40 % aus den DNA-Transposons DDT und Tdd und zu ca. 46 % aus den Retrotransposons DIRS-1 und Skipper-1 (Glöckner und Heidel 2009). Bisher wurde beobachtet, dass DIRS-1 und Skipper-1 während der Interphase große Cluster an der Peripherie des Zellkerns aufzeigen, welche sich jedoch während der Mitose in 6 einzelne Punkte aufteilen. Diese repräsentieren die 6 Centromere der Chromosomen, welche sich im Verlauf der Mitose komprimieren (Kaller *et al.* 2007).

Das Springen in heterochromatische Bereiche lässt sich auch bei dem LTR-Retrotransposon Ty5 aus *S. cerevisiae* erkennen. Der Integrationsort dieses mobilen Elements ist vorwiegend das Heterochromatin der Telomere. Hierbei geht ein 6-Aminosäuren-langes Motiv (LXSSXP) der Integrase am C-Terminus eine Interaktion mit Heterochromatin-Proteinen wie Sir4 ein (Xie *et al.* 2001). Einen anderen Mechanismus für die Erkennung heterochromatischer Bereiche zeigt das Retrotransposon des Pilzes *Magnaporthe grisea*, dessen Genom, ähnlich dem von *D. discoideum*, eine hohe Gendichte aufweist (Dean *et al.* 2005). Es findet heterochromatische Bereiche mittels einer Chromodomäne, die sich bei einigen Ty3/*gypsy*-Typ Retrotransposons im verlängerten C-terminalen Bereich der Integrase befindet. Diese Chromodomäne interagiert mit CenH3, einem typischen Marker für Heterochromatin im Centromer, und dem zweifach methylierten Lysinrest am Histon 3 (H3K9me2). Kaller *et al.* 2006 zeigten, dass auch das *D. discoideum* Retrotransposon DIRS-1 im Centromer akkumuliert, da es mit dem Heterochromatin Protein (HP1, HcpA) kolokalisiert. HcpA identifiziert aufgrund seiner Chromodomäne (CHD) das methylierte H3K9-Motiv im Heterochromatin und bindet an dieses.

Das LTR-Retrotransposon Skipper besitzt ebenfalls eine solche Chromodomäne. Es zeigt interessante Parallelen zu anderen Chromodomänen-besitzenden Ty3/*gypsy*-Typ Retrotransposons in Pflanzen und Pilzen, welche deshalb auch als Chromoviren bezeichnet werden. Ein Beispiel aus diesem Bereich ist das oben schon angesprochene Retrotransposon MAGGY aus dem Genom von *Magnaporthe grisea*. Dieses integriert zielgerichtet in

Heterochromatin mittels einer Interaktion zwischen seiner Chromodomäne und H3K9me2 und H3K9me3 (Gao *et al.* 2008). Bei der Chromodomäne von MAGGY handelt es sich um eine kanonische Chromodomäne bzw. um eine sogenannte Chromodomäne der Gruppe 1 (Gruppe-1-CHD). Die Chromodomänen der Gruppe 2 (Gruppe-2-CHD) von LTR-Retrotransposons hingegen sind Derivate der Gruppe-1-CHDs. Ihnen fehlen meist die aromatischen Aminosäuren auf Position eins und Position drei, welche für die Bildung des sogenannten „Käfigs“ und somit die Möglichkeit zur Bindung an Heterochromatinmarker verantwortlich sind (siehe Abbildung 52) (Gao *et al.* 2008).

Die Chromodomäne von Skipper-1 kann ebenfalls in die CHD der Gruppe 1 eingeordnet werden. Sie zeigt Ähnlichkeit zu der Chromodomäne des *D. discoideum*-Heterochromatin-Proteins HcpA (siehe Abbildung 52). Die HcpA-CHD steht repräsentativ für die Gruppe 1 der Chromodomänen, was mit der Akkumulation von HcpA an Heterochromatin einhergeht.

Die in dieser Arbeit untersuchte Hypothese, dass die kanonische Chromodomäne der Gruppe 1 von Skipper-1 auch in der Lage ist, den typischen Marker für Heterochromatin H3K9 zu identifizieren und das Retrotransposon aufgrund dessen in die Bereiche der Centromere geleitet wird, konnte nicht eindeutig bestätigt werden. Zwar zeigten die *Pulldown*-Versuche zwischen der isolierten Chromodomäne von Skipper-1 und modifizierten H3-Peptiden, dass die Skipper-1-CHD selektiv nur an Histon-Peptide bindet, jedoch war sowohl eine Bindung an den Heterochromatin-Marker H3K9(me3), als auch die für Euchromatin typische Modifikation H3K4(me3) zu beobachten. Es wurden in dieser Arbeit die Untersuchungen von Földesi 2010 erweitert. Durch *in vivo*-Immunfluoreszenz-Analysen sollte eine Kollokalisierung zwischen dem Retrotransposon Skipper-1 und dem *D. discoideum*-Heterochromatin-Protein HcpA beobachtet werden (Földesi 2010). Zwar konnte in dieser Arbeit exprimiertes HcpA durch RFP im Zellkern sichtbar gemacht und lokalisiert werden, jedoch war eine Kollokalisierung mit CHD-GFP nicht zu beobachten. Möglicherweise wurde die kurze Chromodomäne durch den GFP-Tag falsch gefaltet und die Interaktion mit H3K9 war dadurch nicht mehr möglich. Auch eine Vergrößerung der Interaktionsfläche durch das Einbeziehen eines Integrase-Teils, oder gar des ganzen Skipper-1-Elements zeigten keine spezifischen Ergebnisse. Vielmehr scheint eine Überexpression der GFP-getaggen Proteine in der Zelle wahrscheinlich, weshalb man weiterhin einen alternativen *D. discoideum*-Expressionsvektor testen könnte. Um zu untersuchen, ob wirklich die CHD von Skipper-1 dafür verantwortlich ist, dass dieses in

Heterochromatin gezogen wird, könnte man auch das genetisch markierte Skipper-1-Element einsetzen. Indem man dessen Chromodomäne mutiert, oder gar deletiert und nach der Durchführung des Retrotranspositionstests die Integrationsorte dieses Element untersucht. Gao *et al.* tauschten bei dem vor RNA-Polymerase-II transkribierenden Tf1-Chromovirus aus *Schizosaccharomyces pombe* (Hizi und Levin 2005) die Chromodomäne gegen die von MAGGY aus *Magnaporthe grisea* integriert zielgerichtet in Heterochromatin. Durch den Austausch der Chromodomänen konnte man eine solche Integrationspräferenz auch bei Tf1 beobachten (Gao *et al.* 2008). Ein Austausch der Chromodomäne des Chromovirus Tf1 gegen die von Skipper-1 und einer anschließenden Analyse bezüglich der Integrationsorte von Tf1 wäre ebenfalls interessant. Zudem wurden durch vorherige Arbeiten beobachtet, dass das DGLT-A-Retrotransposon aus *Dictyostelium fasciculatum* (Df) hinter tRNA-Gene integriert (Spaller 2015). In diesem Element fand man eine für DGLT-A untypische Chromodomäne. Für zukünftige Versuche könnte man ein genetisch markiertes Df-DGLT-A-Element generieren und dessen Integrationsort identifizieren, nachdem bei diesem die Chromodomäne durch die von Skipper-1 ausgetauscht wurde.

Durch Spaller *et al.* 2016 wurde beobachtet, dass in dem Genom von *D. discoideum* neben Skipper-1 mit einer Chromodomäne der Gruppe 1 ein weiteres Skipper-Element existiert. Skipper-2, dessen Chromodomäne denen der Gruppe 2 angehört. Chromoviren, die eine Chromodomäne der Gruppe 2 enthalten, findet man hauptsächlich in Pflanzen (Gao *et al.* 2008). Trotz der fehlenden aromatischen Aminosäuren an zwei Positionen, und damit der fehlenden Ausprägung des „Käfigs“ zur Interaktion mit dem H3K9-Motiv, können auch diese CHDs die Retrotransposons in heterochromatische Bereiche ziehen (Gao *et al.* 2008). Zudem fällt auf, dass die Chromodomänen der Gruppe 2 eine höhere Ähnlichkeit zur Chromoshadow-Domänen (CSD) besitzen. Diese sind für die Homo- bzw. Heterodimerisierung der jeweiligen heterochromatischen Proteine - HcpA in *D. discoideum* - verantwortlich. CSDs können demnach als Proteininteraktionsflächen genutzt werden, die möglicherweise spezifische, an Heterochromatin bindende Proteine erkennen und somit die Chromoviren auf diese Weise in das Heterochromatin leiten (Gao *et al.* 2008). Dennoch ist erkennbar, dass die meisten CHD-2-Chromoviren nicht spezifisch im Heterochromatin akkumulieren, sondern oftmals über die gesamten Chromosomen verteilt sind (Neumann *et al.* 2011). Der Vergleich der beiden Skipper-Elemente in *D. discoideum* zeigt, dass Skipper-1 mit einer kanonischen Chromodomäne der Gruppe 1 in heterochromatischen Centromeren lokalisiert ist,

wohingegen Skipper-2, dessen Chromodomäne der CSD ähnelt, hinter tRNA-Genen zu finden ist (Spaller *et al.* 2016). Es kann angenommen werden, dass mit dem Auseinanderdriften der Gruppe-2-CHD von der kanonischen CHD das Skipper-2-Element die Affinität zum Centromer verlor und durch Selektion und Anpassung eine neue Integrationspräferenz, weg von heterochromatischen Regionen bzw. Centromeren, hin zu intergenischen Bereichen, hinter tRNA-Gene entwickelte. Interessanterweise konnte man innerhalb der Chromoviren in Pflanzen kalkulieren, dass der Übergang von kanonischen CHDs zu CHDs der Gruppe 2 vor 400-500 Millionen Jahren stattgefunden haben muss (Novikov *et al.* 2012). Dies entspricht ungefähr der Zeit, in der die Dictyosteliden sich aus ihrem letzten gemeinsamen Vorfahren entwickelten (Heidel *et al.* 2011), was die Hypothese der Entwicklung der Skipper-2-Elementen und der dabei neu gewonnenen Integrationspräferenz hinter tRNA-Genen in der monophyletischen Evolution der sozialen Amöben unterstützen könnte.

5 Zusammenfassung

Transposable Elemente besitzen die Fähigkeit, sich innerhalb ihrer Wirts-Zelle zu amplifizieren. Durch ihre intrinsische Integration können dabei Insertionsmutagenesen in Protein-codierenden Bereichen entstehen, die die Fitness des Wirtes negativ beeinflussen. Einige transposable Elemente haben daher Mechanismen entwickelt, die sie zur Identifizierung von sicheren Integrationszielen nutzen. In dieser Arbeit wurde der molekulare Mechanismus der Integrationsziel-Erkennung des LTR-Retrotransposons DGLT-A aus der sozialen Amöbe *Dictyostelium discoideum* untersucht. DGLT-A integriert im haploiden und kompakten Genom von *D. discoideum* positionsspezifisch ca. 15 bp vor tRNA-Genen. Es wurde festgestellt, dass DGLT-A den Präinitiationskomplex der für die Transkription von tRNA-Genen zuständigen RNA-Polymerase III für die Identifizierung von Integrationszielen nutzt. Der Präinitiationskomplex besteht aus den zwei Transkriptionsfaktor-Komplexen TFIIIB und TFIIIC. Protein-Protein-Interaktionsanalysen mittels Hefe-Zwei-Hybrid System und darauf aufbauenden *Pulldown*-Versuchen zeigten, dass zwei DGLT-A-Proteine an der zielgerichteten Integration beteiligt sind: die Ribonuklease-H (RNH) und die Integrase (IN). Beide Proteine interagieren mit der aus dem TFIIIC-Komplex stammenden Untereinheit Tfc4. Ein Strukturmerkmal von Tfc4 besteht darin, dass das Protein 12 Tetratricopeptid-Repeats (TPRs) enthält, von denen die TPRs 1-10 ein zentrales *Array* bilden. Die DGLT-A-Proteine RNH und IN interagieren spezifisch mit TPR 7 und 8. Diese TPR-Region vermittelt die Assemblierung der beiden TFIIIC-Subkomplexe τ A und τ B und die anschließende Rekrutierung von TFIIIB. Aus dieser Arbeit kann daher die Hypothese abgeleitet werden, dass der DGLT-A-Präintegrationskomplex aufgrund einer Konkurrenz mit τ B um die Bindung an τ A Zugang zur chromosomalen DNA oberhalb von tRNA-Genen erlangt.

DGLT-A aus *D. discoideum* zeigt eine ähnliche Integrationsspezifität ca. 15 bp oberhalb von tRNA-Genen wie das LTR-Retrotransposon Ty3 aus *Saccharomyces cerevisiae*. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die beiden Elemente dafür zwei unterschiedliche molekulare Mechanismen nutzen. Diese Arbeit beschreibt somit ein Beispiel der „konvergenten Evolution“, da zwei LTR-Retrotransposons, aus phylogenetisch weit voneinander entfernten Bereichen, das gleiche Problem auf ähnliche Weise gelöst haben. Beide Elemente integrieren zielgerichtet und somit sicher in kompakten Genomen ca. 15 bp vor tRNA-Gene. Die Ty3-Integrase interagiert während der Initiation der POLIII-Transkription mit dem TBP/Brf1-Heterodimer des TFIIIB-Komplexes, wohingegen DGLT-A-RNH

und -Integrase erst nach der Rekrutierung mit der $\tau A/\tau B$ -Interaktion konkurrieren und damit während der Elongation der Transkription Zugang zur genomischen DNA bekommen.

6 Abstract

Transposable elements (TE) are able to amplify as selfish DNA elements in genomes. Their intrinsic integration can cause insertional mutagenesis of protein-coding genes and challenge their host's fitness. To avoid compromising the genome integrity some TEs developed mechanisms for site-specific integration. This study describes the molecular mechanism of position-specific integration by the LTR-retrotransposon DGLT-A in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. In the gene dense haploid genome of *D. discoideum* DGLT-A integrates position-specifically 15 bp upstream of tRNA genes. DGLT-A uses contacts with the preinitiation complex of RNA polymerase III, which is composed of the complexes TFIIIB and TFIIIC, to identify integration sites upstream of tRNA genes. Yeast two hybrid screening and in vitro pulldown experiments determined that DGLT-A uses two retrotransposon-encoded proteins to interact with the TFIIIC complex: ribonuclease H (RNH) and integrase (IN). Both proteins interact with TFIIIC subunit Tfc4. Tfc4 contains 12 tetratricopeptide repeats (TPRs) of which TPR1-10 are arranged in a central TPR array. We discovered that DGLT-A-RNH and -IN interact with an interface that covers TPR 7 and 8. A major function of this interface is to connect TFIIIC subcomplexes τA and τB and to facilitate TFIIIB assembly in the RNA polymerase III transcription complex. Thus, we hypothesize that the DGLT-A intasome gets access to genomic DNA for integration during tRNA gene transcription by competing with τB for binding at the TPR 7/8 surface in τA .

Results from this study suggest that the distantly related amoebozoan *D. discoideum* LTR-retrotransposon DGLT-A and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* element Ty3 evolved targeted integration upstream of tRNA genes by convergent evolution. Both retrotransposons solved the problem of finding safe integration sites in compact genomes by targeting to regions close to tRNA genes, but they use different molecular mechanisms to identify their target site 15 bp upstream of tRNA genes. Whereas Ty3-encoded integrase interacts with the TBP/Brf1 heterodimer of TFIIIB suggesting competition of Ty3 during the initiation of POLIII transcription, DGLT-A-RNH and -IN presumably compete with $\tau A/\tau B$ interaction during transcription elongation.

7 Literatur

- Acker J, Conesa C, Lefebvre O.** 2013. Yeast RNA polymerase III transcription factors and effectors. *Biochim Biophys Acta*, 1829 (3-4):283-295.
- Agrawal A, Eastman QM, Schatz DG.** 1998. Transposition mediated by RAG1 and RAG2 and its implications for the evolution of the immune system. *Nature*, 394 (6695):744-751.
- Anzai T, Osanai M, Hamada M, Fujiwara H.** 2005. Functional roles of 3'-terminal structures of template RNA during in vivo retrotransposition of non-LTR retrotransposon, R1Bm. *Nucleic Acids Res*, 33 (6):1993-2002.
- Ayarpadikannan S, Kim HS.** 2014. The impact of transposable elements in genome evolution and genetic instability and their implications in various diseases. *Genomics Inform*, 12 (3):98-104.
- Aye M, Dildine SL, Claypool JA, Jourdain S, Sandmeyer SB.** 2001. A truncation mutant of the 95-kilodalton subunit of transcription factor IIIC reveals asymmetry in Ty3 integration. *Mol Cell Biol*, 21 (22):7839-7851.
- Babushok DV, Ostertag EM, Courtney CE, Choi JM, Kazazian HH, Jr.** 2006. L1 integration in a transgenic mouse model. *Genome Res*, 16 (2):240-250.
- Badge RM, Alisch RS, Moran JV.** 2003. ATLAS: a system to selectively identify human-specific L1 insertions. *Am J Hum Genet*, 72 (4):823-838.
- Baker RE, Gabrielsen O, Hall BD.** 1986. Effects of tRNA^{Tyr} point mutations on the binding of yeast RNA polymerase III transcription factor C. *J Biol Chem*, 261 (12):5275-5282.
- Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T.** 2001. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, 410 (6824):120-124.
- Barciszewska MZ, Perrigue PM, Barciszewski J.** 2016. tRNA--the golden standard in molecular biology. *Mol Biosyst*, 12 (1):12-17.
- Barlow DP.** 1993. Methylation and imprinting: from host defense to gene regulation? *Science*, 260 (5106):309-310.
- Batzler MA, Deininger PL.** 2002. Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet*, 3 (5):370-379.
- Bäuerle A, Mutzel R.** 1994. Nucleotide sequence of the gene for ribosomal protein S17 from *Dictyostelium discoideum*. *Biochim Biophys Acta*, 1260:223-226.
- Beck P, Dingermann T, Winckler T.** 2002. Transfer RNA Gene-targeted Retrotransposition of *Dictyostelium* TRE5-A into a Chromosomal UMP Synthase Gene Trap. *Journal of Molecular Biology*, 318 (2):273-285.
- Blus BJ, Wiggins K, Khorasanizadeh S.** 2011. Epigenetic virtues of chromodomains. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 46 (6):507-526.
- Boeke J, Eickbush T, Sandmeyer S, Voytas D.** 2006. Index of Viruses-Pseudoviridae (2006). *ICTVdB-The Universal Virus Database, version, 4.*
- Boeke JD.** 2013. Fungal, Plant and Animal Retrotransposon Elements. *Handbook of Proteolytic Enzymes (3rd Edition)*:190-195.

- Boeke JD, Corces VG.** 1989. Transcription and reverse transcription of retrotransposons. *Annu Rev Microbiol*, 43:403-434.
- Boeke JD, Sandmeyer SB.** 1991. Yeast transposable elements. *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*, 1:193-261.
- Boeke JD, Chapman KB.** 1991. Retrotransposition mechanisms. *Curr Opin Cell Biol*, 3 (3):502-507.
- Bonner JT.** 1952. The pattern of differentiation in amoeboid slime molds. *The American Naturalist*, 86 (827):79-89.
- Bonner JT, Lamont DS.** 2005. Behavior of cellular slime molds in the soil. *Mycologia*, 97 (1):178-184.
- Bottomley MJ.** 2004. Structures of protein domains that create or recognize histone modifications. *EMBO Rep*, 5 (5):464-469.
- Bridier-Nahmias A, Tchalikian-Cosson A, Baller JA, Menouni R, Fayol H, Flores A, Saib A, Werner M, Voytas DF, Lesage P.** 2015. Retrotransposons. An RNA polymerase III subunit determines sites of retrotransposon integration. *Science*, 348 (6234):585-588.
- Buchon N, Vaury C.** 2006. RNAi: a defensive RNA-silencing against viruses and transposable elements. *Heredity (Edinb)*, 96 (2):195-202.
- Bukenberger M, Marschalek R, Salzburger W, Dingermann T.** 1991. Nuclear factors which bind to Dictyostelium discoideum transfer RNA genes. *Curr Genet*, 20 (1-2):129-135.
- Bukenberger M, Dingermann T, Meissner W, Seifart KH, Winckler T.** 1994. Isolation of transcription factor IIIC from Dictyostelium discoideum. *Eur J Biochem*, 220 (3):839-846.
- Cappello J, Cohen SM, Lodish HF.** 1984. Dictyostelium transposable element DIRS-1 preferentially inserts into DIRS-1 sequences. *Mol Cell Biol*, 4 (10):2207-2213.
- Cappello J, Handelsman K, Cohen SM, Lodish HF.** 1985. Structure and regulated transcription of DIRS-1: an apparent retrotransposon of Dictyostelium discoideum. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 50:759-767.
- Capy P, Gasperi G, Biemont C, Bazin C.** 2000. Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites? *Heredity (Edinb)*, 85 (Pt 2):101-106.
- Castel SE, Martienssen RA.** 2013. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nat Rev Genet*, 14 (2):100-112.
- Chalker DL, Sandmeyer SB.** 1990. Transfer RNA genes are genomic targets for de Novo transposition of the yeast retrotransposon Ty3. *Genetics*, 126 (4):837-850.
- Chalker DL, Sandmeyer SB.** 1992. Ty3 integrates within the region of RNA polymerase III transcription initiation. *Genes Dev*, 6 (1):117-128.
- Chaussivert N, Conesa C, Shaaban S, Sentenac A.** 1995. Complex interactions between yeast TFIIB and TFIIC. *J Biol Chem*, 270 (25):15353-15358.
- Cherepanov P, Ambrosio AL, Rahman S, Ellenberger T, Engelman A.** 2005. Structural basis for the recognition between HIV-1 integrase and transcriptional coactivator p75. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (48):17308-17313.

- Cherepanov P, Maertens G, Proost P, Devreese B, Van Beeumen J, Engelborghs Y, De Clercq E, Debyser Z.** 2003. HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells. *J Biol Chem*, 278 (1):372-381.
- Cherry JM, Hong EL, Amundsen C, Balakrishnan R, Binkley G, Chan ET, Christie KR, Costanzo MC, Dwight SS, Engel SR, Fisk DG, Hirschman JE, Hitz BC, Karra K, Krieger CJ, Miyasato SR, Nash RS, Park J, Skrzypek MS, Simison M, Weng S, Wong ED.** 2012. Saccharomyces Genome Database: the genomics resource of budding yeast. *Nucleic Acids Res*, 40 (Database issue):D700-705.
- Cheung S, Ma L, Chan PH, Hu HL, Mayor T, Chen HT, Measday V.** 2016. Ty1 Integrase Interacts with RNA Polymerase III-specific Subcomplexes to Promote Insertion of Ty1 Elements Upstream of Polymerase (Pol) III-transcribed Genes. *J Biol Chem*, 291 (12):6396-6411.
- Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S.** 1991. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (21):9578-9582.
- Chung T, Siol O, Dingermann T, Winckler T.** 2007. Protein interactions involved in tRNA gene-specific integration of Dictyostelium discoideum non-long terminal repeat retrotransposon TRE5-A. *Mol Cell Biol*, 27 (24):8492-8501.
- Clark DJ, Bilanchone VW, Haywood LJ, Dildine SL, Sandmeyer SB.** 1988. A yeast sigma composite element, TY3, has properties of a retrotransposon. *J Biol Chem*, 263 (3):1413-1423.
- Craig NL, Craigie R, Gellert M, Lambowitz A.** 2002. Mobile DNA II. Washington, DC: American Society of Microbiology.
- Craigie R, Bushman FD.** 2012. HIV DNA integration. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2 (7):a006890.
- Daboussi MJ, Capy P.** 2003. Transposable elements in filamentous fungi. *Annu Rev Microbiol*, 57:275-299.
- Dean RA, Talbot NJ, Ebbole DJ, Farman ML, Mitchell TK, Orbach MJ, Thon M, Kulkarni R, Xu JR, Pan H, Read ND, Lee YH, Carbone I, Brown D, Oh YY, Donofrio N, Jeong JS, Soanes DM, Djonovic S, Kolomiets E, Rehmeyer C, Li W, Harding M, Kim S, Lebrun MH, Bohnert H, Coughlan S, Butler J, Calvo S, Ma LJ, Nicol R, Purcell S, Nusbaum C, Galagan JE, Birren BW.** 2005. The genome sequence of the rice blast fungus Magnaporthe grisea. *Nature*, 434 (7036):980-986.
- Deininger PL, Batzer MA.** 2002. Mammalian retroelements. *Genome Res*, 12 (10):1455-1465.
- Devine SE, Boeke JD.** 1996. Integration of the yeast retrotransposon Ty1 is targeted to regions upstream of genes transcribed by RNA polymerase III. *Genes Dev*, 10 (5):620-633.
- Dinant C, Luijsterburg MS.** 2009. The emerging role of HP1 in the DNA damage response. *Mol Cell Biol*, 29 (24):6335-6340.
- Ducrot C, Lefebvre O, Landrieux E, Guirouilh-Barbat J, Sentenac A, Acker J.** 2006. Reconstitution of the yeast RNA polymerase III transcription system with all recombinant factors. *J Biol Chem*, 281 (17):11685-11692.
- Dumay-Odelot H, Acker J, Arrebola R, Sentenac A, Marck C.** 2002. Multiple roles of the tau131 subunit of yeast transcription factor IIIC (TFIIIC) in TFIIIB assembly. *Mol Cell Biol*, 22 (1):298-308.

- Dumay H, Rubbi L, Sentenac A, Marck C.** 1999. Interaction between yeast RNA polymerase III and transcription factor TFIIIC via ABC10alpha and tau131 subunits. *J Biol Chem*, 274 (47):33462-33468.
- Egelhoff TT, Brown SS, Manstein DJ, Spudich JA.** 1989. Hygromycin resistance as a selectable marker in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Cell Biol*, 9 (5):1965-1968.
- Eichinger L, Pachebat JA, Glöckner G, Rajandream MA, Sugang R, Berriman M, Song J, Olsen R, Szafranski K, Xu Q, Tunggal B, Kummerfeld S, Madera M, Konfortov BA, Rivero F, Bankier AT, Lehmann R, Hamlin N, Davies R, Gaudet P, Fey P, Pilcher K, Chen G, Saunders D, Sodergren E, Davis P, Kerhornou A, Nie X, Hall N, Anjard C, Hemphill L, Bason N, Farbrother P, Desany B, Just E, Morio T, Rost R, Churcher C, Cooper J, Haydock S, van Driessche N, Cronin A, Goodhead I, Muzny D, Mourier T, Pain A, Lu M, Harper D, Lindsay R, Hauser H, James K, Quiles M, Madan Babu M, Saito T, Buchrieser C, Wardroper A, Felder M, Thangavelu M, Johnson D, Knights A, Loulseged H, Mungall K, Oliver K, Price C, Quail MA, Urushihara H, Hernandez J, Rabinowitsch E, Steffen D, Sanders M, Ma J, Kohara Y, Sharp S, Simmonds M, Spiegler S, Tivey A, Sugano S, White B, Walker D, Woodward J, Winckler T, Tanaka Y, Shaulsky G, Schleicher M, Weinstock G, Rosenthal A, Cox EC, Chisholm RL, Gibbs R, Loomis WF, Platzer M, Kay RR, Williams J, Dear PH, Noegel AA, Barrell B, Kuspa A.** 2005. The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, 435 (7038):43-57.
- Eickbush TH.** 1997. Telomerase and retrotransposons: which came first? *Science*, 277 (5328):911-912.
- Eickbush TH, Jamburuthugoda VK.** 2008. The diversity of retrotransposons and the properties of their reverse transcriptases. *Virus Res*, 134 (1-2):221-234.
- Engelman A, Bushman FD, Craigie R.** 1993. Identification of discrete functional domains of HIV-1 integrase and their organization within an active multimeric complex. *EMBO J*, 12 (8):3269-3275.
- Ewing AD, Kazazian HH, Jr.** 2010. High-throughput sequencing reveals extensive variation in human-specific L1 content in individual human genomes. *Genome Res*, 20 (9):1262-1270.
- Fedoroff NV.** 1989. About maize transposable elements and development. *Cell*, 56 (2):181-191.
- Feng G, Leem YE, Levin HL.** 2013. Transposon integration enhances expression of stress response genes. *Nucleic Acids Res*, 41 (2):775-789.
- Feng Q, Moran JV, Kazazian HH, Jr., Boeke JD.** 1996. Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell*, 87 (5):905-916.
- Feschotte C, Pritham EJ.** 2007. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annu Rev Genet*, 41:331-368.
- Fields S, Song O.** 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340 (6230):245-246.
- Filee J, Siguier P, Chandler M.** 2007. Insertion sequence diversity in archaea. *Microbiol Mol Biol Rev*, 71 (1):121-157.
- Finnegan DJ.** 1989. Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends Genet*, 5 (4):103-107.

- Finnegan DJ.** 2012. Retrotransposons. *Curr Biol*, 22 (11):R432-437.
- Fischer M, Haase I, Simmeth E, Gerisch G, Muller-Taubenberger A.** 2004. A brilliant monomeric red fluorescent protein to visualize cytoskeleton dynamics in Dictyostelium. *FEBS Lett*, 577 (1-2):227-232.
- Földesi B.** 2010. Posttranslationale Chromatin-Modifikationen in Dictyostelium discoideum. *Universität Kassel*, Dissertation.
- Gabriel R, Kutschera I, Bartholomae CC, von Kalle C, Schmidt M.** 2014. Linear amplification mediated PCR--localization of genetic elements and characterization of unknown flanking DNA. *J Vis Exp*, (88):e51543.
- Gabriel R, Eckenberg R, Paruzynski A, Bartholomae CC, Nowrouzi A, Arens A, Howe SJ, Recchia A, Cattoglio C, Wang W, Faber K, Schwarzwaelder K, Kirsten R, Deichmann A, Ball CR, Balaggaan KS, Yanez-Munoz RJ, Ali RR, Gaspar HB, Biasco L, Aiuti A, Cesana D, Montini E, Naldini L, Cohen-Haguenauer O, Mavilio F, Thrasher AJ, Glimm H, von Kalle C, Saurin W, Schmidt M.** 2009. Comprehensive genomic access to vector integration in clinical gene therapy. *Nat Med*, 15 (12):1431-1436.
- Gai X, Voytas DF.** 1998. A single amino acid change in the yeast retrotransposon Ty5 abolishes targeting to silent chromatin. *Mol Cell*, 1 (7):1051-1055.
- Gao D, Jiang N, Wing RA, Jiang J, Jackson SA.** 2015. Transposons play an important role in the evolution and diversification of centromeres among closely related species. *Front Plant Sci*, 6:216.
- Gao X, Havecker ER, Baranov PV, Atkins JF, Voytas DF.** 2003. Translational recoding signals between gag and pol in diverse LTR retrotransposons. *RNA*, 9 (12):1422-1430.
- Gao X, Hou Y, Ebina H, Levin HL, Voytas DF.** 2008. Chromodomains direct integration of retrotransposons to heterochromatin. *Genome Res*, 18 (3):359-369.
- Gbadegesin MA.** 2012. Transposable elements in the genomes: parasites, junks or drivers of evolution? *Afr J Med Med Sci*, 41 Suppl:13-25.
- Geiduschek EP, Tocchini-Valentini GP.** 1988. Transcription by RNA polymerase III. *Annu Rev Biochem*, 57:873-914.
- Geiduschek EP, Kassavetis GA.** 2001. The RNA polymerase III transcription apparatus. *J Mol Biol*, 310 (1):1-26.
- Gilbert N, Lutz-Prigge S, Moran JV.** 2002. Genomic deletions created upon LINE-1 retrotransposition. *Cell*, 110 (3):315-325.
- Glöckner G, Heidel AJ.** 2009. Centromere sequence and dynamics in Dictyostelium discoideum. *Nucleic Acids Res*, 37 (6):1809-1816.
- Glöckner G, Lawal HM, Felder M, Singh R, Singer G, Weijer CJ, Schaap P.** 2016. The multicellularity genes of dictyostelid social amoebas. *Nat Commun*, 7:12085.
- Glöckner G, Szafranski K, Winckler T, Dingermann T, Quail MA, Cox E, Eichinger L, Noegel AA, Rosenthal A.** 2001. The complex repeats of Dictyostelium discoideum. *Genome Res*, 11 (4):585-594.

- Glöckner G, Eichinger L, Szafranski K, Pachebat JA, Bankier AT, Dear PH, Lehmann R, Baumgart C, Parra G, Abril JF, Guigo R, Kumpf K, Tunggal B, Cox E, Quail MA, Platzer M, Rosenthal A, Noegel AA, Dictyostelium Genome Sequencing C.** 2002. Sequence and analysis of chromosome 2 of *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, 418 (6893):79-85.
- Goffeau A.** 2000. Four years of post-genomic life with 6,000 yeast genes. *FEBS Lett*, 480 (1):37-41.
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG.** 1996. Life with 6000 genes. *Science*, 274 (5287):546, 563-547.
- Gogol-Döring A, Ammar I, Gupta S, Bunse M, Miskey C, Chen W, Uckert W, Schulz TF, Izsvak Z, Ivics Z.** 2016. Genome-wide Profiling Reveals Remarkable Parallels Between Insertion Site Selection Properties of the MLV Retrovirus and the piggyBac Transposon in Primary Human CD4(+) T Cells. *Mol Ther*, 24 (3):592-606.
- Guo Y, Levin HL.** 2010. High-throughput sequencing of retrotransposon integration provides a saturated profile of target activity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genome Res*, 20 (2):239-248.
- Gupta SS, Maetzig T, Maertens GN, Sharif A, Rothe M, Weidner-Glunde M, Galla M, Schambach A, Cherepanov P, Schulz TF.** 2013. Bromo- and extraterminal domain chromatin regulators serve as cofactors for murine leukemia virus integration. *J Virol*, 87 (23):12721-12736.
- Han JS.** 2010. Non-long terminal repeat (non-LTR) retrotransposons: mechanisms, recent developments, and unanswered questions. *Mob DNA*, 1 (1):15.
- Hani J, Feldmann H.** 1998. tRNA genes and retroelements in the yeast genome. *Nucleic Acids Res*, 26 (3):689-696.
- Hansen LJ, Chalker DL, Sandmeyer SB.** 1988. Ty3, a yeast retrotransposon associated with tRNA genes, has homology to animal retroviruses. *Mol Cell Biol*, 8 (12):5245-5256.
- Hartl DL, Lozovskaya ER, Lawrence JG.** 1992. Nonautonomous transposable elements in prokaryotes and eukaryotes. *Genetica*, 86 (1-3):47-53.
- Havecker ER, Gao X, Voytas DF.** 2004. The diversity of LTR retrotransposons. *Genome Biol*, 5 (6):225.
- Hayashi MT, Takahashi TS, Nakagawa T, Nakayama J, Masukata H.** 2009. The heterochromatin protein Swi6/HP1 activates replication origins at the pericentromeric region and silent mating-type locus. *Nat Cell Biol*, 11 (3):357-362.
- Hehl EA, Joshi P, Kalpana GV, Prasad VR.** 2004. Interaction between human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and integrase proteins. *J Virol*, 78 (10):5056-5067.
- Heidel AJ, Lawal HM, Felder M, Schilde C, Helps NR, Tunggal B, Rivero F, John U, Schleicher M, Eichinger L, Platzer M, Noegel AA, Schaap P, Glöckner G.** 2011. Phylogeny-wide analysis of social amoeba genomes highlights ancient origins for complex intercellular communication. *Genome Res*, 21 (11):1882-1891.
- Herzig E, Voronin N, Hizi A.** 2012. The removal of RNA primers from DNA synthesized by the reverse transcriptase of the retrotransposon Tf1 is stimulated by Tf1 integrase. *J Virol*, 86 (11):6222-6230.

- Hickey A, Esnault C, Majumdar A, Chatterjee AG, Iben JR, McQueen PG, Yang AX, Mizuguchi T, Grewal SI, Levin HL.** 2015. Single-Nucleotide-Specific Targeting of the Tf1 Retrotransposon Promoted by the DNA-Binding Protein Sap1 of *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, 201 (3):905-924.
- Hizi A, Levin HL.** 2005. The integrase of the long terminal repeat-retrotransposon tf1 has a chromodomain that modulates integrase activities. *J Biol Chem*, 280 (47):39086-39094.
- Hofmann J, Schumann G, Borschett G, Gosseringer R, Bach M, Bertling WM, Marschalek R, Dingermann T.** 1991. Transfer RNA genes from *Dictyostelium discoideum* are frequently associated with repetitive elements and contain consensus boxes in their 5' and 3'-flanking regions. *J Mol Biol*, 222 (3):537-552.
- Holton NJ, Goodwin TJ, Butler MI, Poulter RT.** 2001. An active retrotransposon in *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res*, 29 (19):4014-4024.
- Hua-Van A, Le Rouzic A, Maisonhaute C, Capy P.** 2005. Abundance, distribution and dynamics of retrotransposable elements and transposons: similarities and differences. *Cytogenet Genome Res*, 110 (1-4):426-440.
- Huang CR, Burns KH, Boeke JD.** 2012. Active transposition in genomes. *Annu Rev Genet*, 46:651-675.
- Ishiguro A, Kassavetis GA, Geiduschek EP.** 2002. Essential roles of Bdp1, a subunit of RNA polymerase III initiation factor TFIIIB, in transcription and tRNA processing. *Mol Cell Biol*, 22 (10):3264-3275.
- Jacobs JZ, Rosado-Lugo JD, Cranz-Mileva S, Ciccaglione KM, Tournier V, Zaratiegui M.** 2015. Arrested replication forks guide retrotransposon integration. *Science*, 349 (6255):1549-1553.
- Jamburuthugoda VK, Eickbush TH.** 2014. Identification of RNA binding motifs in the R2 retrotransposon-encoded reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res*, 42 (13):8405-8415.
- Janssen A, Colmenares SU, Karpen GH.** 2018. Heterochromatin: Guardian of the Genome. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 34:265-288.
- Jones KS, Coleman J, Merkel GW, Laue TM, Skalka AM.** 1992. Retroviral integrase functions as a multimer and can turn over catalytically. *J Biol Chem*, 267 (23):16037-16040.
- Judd J, Feschotte C.** 2018. Transposons take remote control. *Elife*, 7.
- Jurka J, Kapitonov VV, Kohany O, Jurka MV.** 2007. Repetitive sequences in complex genomes: structure and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 8:241-259.
- Kaer K, Speek M.** 2013. Retroelements in human disease. *Gene*, 518 (2):231-241.
- Kaller M, Euteneuer U, Nellen W.** 2006. Differential effects of heterochromatin protein 1 isoforms on mitotic chromosome distribution and growth in *Dictyostelium discoideum*. *Eukaryot Cell*, 5 (3):530-543.
- Kaller M, Foldesi B, Nellen W.** 2007. Localization and organization of protein factors involved in chromosome inheritance in *Dictyostelium discoideum*. *Biol Chem*, 388 (4):355-365.
- Kassavetis GA, Braun BR, Nguyen LH, Geiduschek EP.** 1990. *S. cerevisiae* TFIIIB is the transcription initiation factor proper of RNA polymerase III, while TFIIIA and TFIIIC are assembly factors. *Cell*, 60 (2):235-245.

- Kazazian HH, Jr.** 2004. Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science*, 303 (5664):1626-1632.
- Kessin RH.** 2001. Dictyostelium: evolution, cell biology, and the development of multicellularity. Cambridge University Press.
- Khan E, Mack JP, Katz RA, Kulkosky J, Skalka AM.** 1991. Retroviral integrase domains: DNA binding and the recognition of LTR sequences. *Nucleic Acids Res*, 19 (4):851-860.
- Kim JM, Vanguri S, Boeke JD, Gabriel A, Voytas DF.** 1998. Transposable elements and genome organization: a comprehensive survey of retrotransposons revealed by the complete *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence. *Genome Res*, 8 (5):464-478.
- Kirchner J, Sandmeyer S.** 1993. Proteolytic processing of Ty3 proteins is required for transposition. *J Virol*, 67 (1):19-28.
- Kirchner J, Sandmeyer SB.** 1996. Ty3 integrase mutants defective in reverse transcription or 3'-end processing of extrachromosomal Ty3 DNA. *J Virol*, 70 (7):4737-4747.
- Klebe R, June V, Harriss Z, Sharp D, Douglas M.** 1983. A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast.
- Knecht DA, Cohen SM, Loomis WF, Lodish HF.** 1986. Developmental regulation of Dictyostelium discoideum actin gene fusions carried on low-copy and high-copy transformation vectors. *Mol Cell Biol*, 6 (11):3973-3983.
- Krastanova O, Hadzhitodorov M, Pesheva M.** 2005. Ty Elements of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 19 (sup2):19-26.
- Krishnan L, Li X, Naraharisetty HL, Hare S, Cherepanov P, Engelman A.** 2010. Structure-based modeling of the functional HIV-1 intasome and its inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (36):15910-15915.
- Kuspa A, Loomis WF.** 2006. The Genome of Dictyostelium discoideum. *Methods Mol Biol*, 346:15-30.
- Labrador M, Corces VG.** 1997. Transposable element-host interactions: regulation of insertion and excision. *Annu Rev Genet*, 31:381-404.
- Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T.** 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, 410 (6824):116-120.
- Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259):680-685.
- LaFave MC, Varshney GK, Gildea DE, Wolfsberg TG, Baxevanis AD, Burgess SM.** 2014. MLV integration site selection is driven by strong enhancers and active promoters. *Nucleic Acids Res*, 42 (7):4257-4269.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, et al.** 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409 (6822):860-921.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG.** 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23 (21):2947-2948.

- Larue RC, Plumb MR, Crowe BL, Shkriabai N, Sharma A, DiFiore J, Malani N, Aiyer SS, Roth MJ, Bushman FD, Foster MP, Kvaratskhelia M.** 2014. Bimodal high-affinity association of Brd4 with murine leukemia virus integrase and mononucleosomes. *Nucleic Acids Res*, 42 (8):4868-4881.
- Lauermann V, Boeke JD.** 1997. Plus-strand strong-stop DNA transfer in yeast Ty retrotransposons. *EMBO J*, 16 (21):6603-6612.
- Leem YE, Ripmaster TL, Kelly FD, Ebina H, Heincelman ME, Zhang K, Grewal SI, Hoffman CS, Levin HL.** 2008. Retrotransposon Tf1 is targeted to Pol II promoters by transcription activators. *Mol Cell*, 30 (1):98-107.
- Leng P, Klatte DH, Schumann G, Boeke JD, Steck TL.** 1998. Skipper, an LTR retrotransposon of Dictyostelium. *Nucleic Acids Res*, 26 (8):2008-2015.
- Lesage P, Todeschini AL.** 2005. Happy together: the life and times of Ty retrotransposons and their hosts. *Cytogenet Genome Res*, 110 (1-4):70-90.
- Levin HL, Moran JV.** 2011. Dynamic interactions between transposable elements and their hosts. *Nat Rev Genet*, 12 (9):615-627.
- Levis RW, Ganesan R, Houtchens K, Tolar LA, Sheen FM.** 1993. Transposons in place of telomeric repeats at a Drosophila telomere. *Cell*, 75 (6):1083-1093.
- Liao Y, Willis IM, Moir RD.** 2003. The Brf1 and Bdp1 subunits of transcription factor TFIIIB bind to overlapping sites in the tetratricopeptide repeats of Tfc4. *J Biol Chem*, 278 (45):44467-44474.
- Liao Y, Moir RD, Willis IM.** 2006. Interactions of Brf1 peptides with the tetratricopeptide repeat-containing subunit of TFIIIC inhibit and promote preinitiation complex assembly. *Mol Cell Biol*, 26 (16):5946-5956.
- Lin SS, Nymark-McMahon MH, Yieh L, Sandmeyer SB.** 2001. Integrase mediates nuclear localization of Ty3. *Mol Cell Biol*, 21 (22):7826-7838.
- Lisch D.** 2013. How important are transposons for plant evolution? *Nat Rev Genet*, 14 (1):49-61.
- Llano M, Saenz DT, Meehan A, Wongthida P, Peretz M, Walker WH, Teo W, Poeschla EM.** 2006. An essential role for LEDGF/p75 in HIV integration. *Science*, 314 (5798):461-464.
- Lomberk G, Wallrath L, Urrutia R.** 2006. The Heterochromatin Protein 1 family. *Genome Biol*, 7 (7):228.
- Luan DD, Eickbush TH.** 1995. RNA template requirements for target DNA-primed reverse transcription by the R2 retrotransposable element. *Mol Cell Biol*, 15 (7):3882-3891.
- Luan DD, Korman MH, Jakubczak JL, Eickbush TH.** 1993. Reverse transcription of R2Bm RNA is primed by a nick at the chromosomal target site: a mechanism for non-LTR retrotransposition. *Cell*, 72 (4):595-605.
- Ma MY, Che XR, Porceddu A, Niu DK.** 2015. Evaluation of the mechanisms of intron loss and gain in the social amoebae Dictyostelium. *BMC Evol Biol*, 15:286.
- Maertens G, Cherepanov P, Pluymers W, Busschots K, De Clercq E, Debyser Z, Engelborghs Y.** 2003. LEDGF/p75 is essential for nuclear and chromosomal targeting of HIV-1 integrase in human cells. *J Biol Chem*, 278 (35):33528-33539.
- Mahillon J, Chandler M.** 1998. Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62 (3):725-774.

- Male G, von Appen A, Glatt S, Taylor NM, Cristovao M, Groetsch H, Beck M, Muller CW.** 2015. Architecture of TFIIIC and its role in RNA polymerase III pre-initiation complex assembly. *Nat Commun*, 6:7387.
- Malicki M, Iliopoulou M, Hammann C.** 2017. Retrotransposon Domestication and Control in *Dictyostelium discoideum*. *Front Microbiol*, 8:1869.
- Malik HS, Eickbush TH.** 1999. Modular evolution of the integrase domain in the Ty3/Gypsy class of LTR retrotransposons. *J Virol*, 73 (6):5186-5190.
- Malik HS, Henikoff S, Eickbush TH.** 2000. Poised for contagion: evolutionary origins of the infectious abilities of invertebrate retroviruses. *Genome Res*, 10 (9):1307-1318.
- Maniak M, Nellen W.** 1989. pISAR, a tool for cloning genomic sequences adjacent to the site of vector integration. *Nucleic Acids Res*, 17 (12):4894.
- Marck C, Lefebvre O, Carles C, Riva M, Chaussivert N, Ruet A, Sentenac A.** 1993. The TFIIIB-assembling subunit of yeast transcription factor TFIIIC has both tetratricopeptide repeats and basic helix-loop-helix motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (9):4027-4031.
- Marschalek R, Brechner T, Amon-Bohm E, Dingermann T.** 1989. Transfer RNA genes: landmarks for integration of mobile genetic elements in *Dictyostelium discoideum*. *Science*, 244 (4911):1493-1496.
- Marschalek R, Hofmann J, Schumann G, Dingermann T.** 1992a. Two distinct subforms of the retrotransposable DRE element in NC4 strains of *Dictyostelium discoideum*. *Nucleic Acids Res*, 20 (23):6247-6252.
- Marschalek R, Hofmann J, Schumann G, Gosseringer R, Dingermann T.** 1992b. Structure of DRE, a retrotransposable element which integrates with position specificity upstream of *Dictyostelium discoideum* tRNA genes. *Mol Cell Biol*, 12 (1):229-239.
- Martin SL, Li J, Weisz JA.** 2000. Deletion analysis defines distinct functional domains for protein-protein and nucleic acid interactions in the ORF1 protein of mouse LINE-1. *J Mol Biol*, 304 (1):11-20.
- Mathias SL, Scott AF, Kazazian HH, Jr., Boeke JD, Gabriel A.** 1991. Reverse transcriptase encoded by a human transposable element. *Science*, 254 (5039):1808-1810.
- Matthews GD, Goodwin TJ, Butler MI, Berryman TA, Poulter RT.** 1997. pCal, a highly unusual Ty1/copia retrotransposon from the pathogenic yeast *Candida albicans*. *J Bacteriol*, 179 (22):7118-7128.
- McClintock B.** 1948. Mutable loci in maize. *Carnegie Institute of Washington*, 47:155-169.
- McClintock B.** 1950. The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 36 (6):344-355.
- Miller K, Lynch C, Martin J, Herniou E, Tristem M.** 1999. Identification of multiple Gypsy LTR-retrotransposon lineages in vertebrate genomes. *J Mol Evol*, 49 (3):358-366.
- Miller MD, Farnet CM, Bushman FD.** 1997. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol*, 71 (7):5382-5390.
- Moir RD, Willis IM.** 2004. Tetratricopeptide repeats of Tfc4 and a limiting step in the assembly of the initiation factor TFIIIB. *Adv Protein Chem*, 67:93-121.

- Moir RD, Puglia KV, Willis IM.** 2000. Interactions between the tetratricopeptide repeat-containing transcription factor TFIIIC131 and its ligand, TFIIIB70. Evidence for a conformational change in the complex. *J Biol Chem*, 275 (34):26591-26598.
- Moir RD, Puglia KV, Willis IM.** 2002. Autoinhibition of TFIIIB70 binding by the tetratricopeptide repeat-containing subunit of TFIIIC. *J Biol Chem*, 277 (1):694-701.
- Muchardt C, Guilleme M, Seeler JS, Trouche D, Dejean A, Yaniv M.** 2002. Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1alpha. *EMBO Rep*, 3 (10):975-981.
- Neumann P, Navratilova A, Koblizkova A, Kejnovsky E, Hribova E, Hobza R, Widmer A, Dolezel J, Macas J.** 2011. Plant centromeric retrotransposons: a structural and cytogenetic perspective. *Mob DNA*, 2 (1):4.
- Novikov A, Smyshlyaev G, Novikova O.** 2012. Evolutionary history of LTR retrotransposon chromodomains in plants. *Int J Plant Genomics*, 2012:874743.
- Nowak E, Miller JT, Bona MK, Studnicka J, Szczepanowski RH, Jurkowski J, Le Grice SF, Nowotny M.** 2014. Ty3 reverse transcriptase complexed with an RNA-DNA hybrid shows structural and functional asymmetry. *Nat Struct Mol Biol*, 21 (4):389-396.
- Nymark-McMahon MH, Sandmeyer SB.** 1999. Mutations in nonconserved domains of Ty3 integrase affect multiple stages of the Ty3 life cycle. *J Virol*, 73 (1):453-465.
- Nymark-McMahon MH, Beliakova-Bethell NS, Darlix JL, Le Grice SF, Sandmeyer SB.** 2002. Ty3 integrase is required for initiation of reverse transcription. *J Virol*, 76 (6):2804-2816.
- Ohshima K, Okada N.** 2005. SINEs and LINEs: symbionts of eukaryotic genomes with a common tail. *Cytogenetic and genome research*, 110 (1-4):475-490.
- Oliver KR, Greene WK.** 2009. Transposable elements: powerful facilitators of evolution. *Bioessays*, 31 (7):703-714.
- Orgel LE, Crick FH.** 1980. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature*, 284 (5757):604-607.
- Ostertag EM, Kazazian HH, Jr.** 2001a. Twin priming: a proposed mechanism for the creation of inversions in L1 retrotransposition. *Genome Res*, 11 (12):2059-2065.
- Ostertag EM, Kazazian HH, Jr.** 2001b. Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu Rev Genet*, 35:501-538.
- Oz I, Avidan O, Hizi A.** 2002. Inhibition of the integrases of human immunodeficiency viruses type 1 and type 2 by reverse transcriptases. *Biochem J*, 361 (Pt 3):557-566.
- Pardue ML, DeBaryshe PG.** 2003. Retrotransposons provide an evolutionarily robust non-telomerase mechanism to maintain telomeres. *Annu Rev Genet*, 37:485-511.
- Parks AR, Li Z, Shi Q, Owens RM, Jin MM, Peters JE.** 2009. Transposition into replicating DNA occurs through interaction with the processivity factor. *Cell*, 138 (4):685-695.
- Perrini B, Piacentini L, Fanti L, Altieri F, Chichiarelli S, Berloco M, Turano C, Ferraro A, Pimpinelli S.** 2004. HP1 controls telomere capping, telomere elongation, and telomere silencing by two different mechanisms in *Drosophila*. *Mol Cell*, 15 (3):467-476.
- Poulter RT, Goodwin TJ.** 2005. DIRS-1 and the other tyrosine recombinase retrotransposons. *Cytogenet Genome Res*, 110 (1-4):575-588.

- Qi X, Sandmeyer S.** 2012. In vitro targeting of strand transfer by the Ty3 retroelement integrase. *J Biol Chem*, 287 (22):18589-18595.
- Raiz J, Damert A, Chira S, Held U, Klawitter S, Hamdorf M, Lower J, Stratling WH, Lower R, Schumann GG.** 2012. The non-autonomous retrotransposon SVA is trans-mobilized by the human LINE-1 protein machinery. *Nucleic Acids Res*, 40 (4):1666-1683.
- Raper K, Rahn A.** 1984. The dictyostelids. *Princeton: Princeton University press*—453 p.
- Raper KB.** 1935. Dictyostelium discoideum, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *J Agricul Res*, 50:135-147.
- Raper KB, Fennell DI.** 1952. Stalk formation in Dictyostelium. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*:25-51.
- Repanas K, Zingler N, Layer LE, Schumann GG, Perrakis A, Weichenrieder O.** 2007. Determinants for DNA target structure selectivity of the human LINE-1 retrotransposon endonuclease. *Nucleic Acids Res*, 35 (14):4914-4926.
- Roger AJ, Simpson AG.** 2009. Evolution: revisiting the root of the eukaryote tree. *Curr Biol*, 19 (4):R165-167.
- Roggo C, Coronado E, Moreno-Forero SK, Harshman K, Weber J, van der Meer JR.** 2013. Genome-wide transposon insertion scanning of environmental survival functions in the polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterium Sphingomonas wittichii RW1. *Environ Microbiol*, 15 (10):2681-2695.
- Romeralo M, Skiba A, Gonzalez-Voyer A, Schilde C, Lawal H, Kedziora S, Cavender JC, Glöckner G, Urushihara H, Schaap P.** 2013. Analysis of phenotypic evolution in Dictyostelia highlights developmental plasticity as a likely consequence of colonial multicellularity. *Proc Biol Sci*, 280 (1764):20130976.
- Rozenfeld S, Thuriaux P.** 2001. Genetic interactions within TFIIIC, the promoter-binding factor of yeast RNA polymerase III. *Mol Genet Genomics*, 265 (4):705-710.
- Ruth J, Conesa C, Dieci G, Lefebvre O, Dusterhoft A, Ottonello S, Sentenac A.** 1996. A suppressor of mutations in the class III transcription system encodes a component of yeast TFIIIB. *EMBO J*, 15 (8):1941-1949.
- Sandmeyer SB, Hansen LJ, Chalker DL.** 1990. Integration specificity of retrotransposons and retroviruses. *Annu Rev Genet*, 24:491-518.
- Sandmeyer SB, Aye M, Menees T.** 2002. Ty3, a position-specific, gypsy-like element in Saccharomyces cerevisiae. Mobile DNA II. American Society of Microbiology, 663-683.
- Sandmeyer SB, Bilanchone VW, Clark DJ, Morcos P, Carle GF, Brodeur GM.** 1988. Sigma elements are position-specific for many different yeast tRNA genes. *Nucleic Acids Res*, 16 (4):1499-1515.
- SanMiguel P, Tikhonov A, Jin YK, Motchoulskaia N, Zakharov D, Melake-Berhan A, Springer PS, Edwards KJ, Lee M, Avramova Z, Bennetzen JL.** 1996. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science*, 274 (5288):765-768.
- Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T.** 2002. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*, 419 (6905):407-411.
- Schaap P.** 2011. Evolutionary crossroads in developmental biology: Dictyostelium discoideum.

- Development*, 138 (3):387-396.
- Schaap P, Winckler T, Nelson M, Alvarez-Curto E, Elgie B, Hagiwara H, Cavender J, Milano-Curto A, Rozen DE, Dingermann T, Mutzel R, Baldauf SL.** 2006. Molecular phylogeny and evolution of morphology in the social amoebas. *Science*, 314 (5799):661-663.
- Schiefner J.** 2014. Untersuchung zur Retrotransposition der mobilen Elemente TRE5-A und DGLT-A aus *Dictyostelium discoideum*. *Friedrich-Schiller Universität, Jena*, Dissertation.
- Schilde C, Skiba A, Schaap P.** 2014. Evolutionary reconstruction of pattern formation in 98 *Dictyostelium* species reveals that cell-type specialization by lateral inhibition is a derived trait. *Evodevo*, 5:34.
- Schumann G, Zundorf I, Hofmann J, Marschalek R, Dingermann T.** 1994. Internally located and oppositely oriented polymerase II promoters direct convergent transcription of a LINE-like retroelement, the *Dictyostelium* repetitive element, from *Dictyostelium discoideum*. *Mol Cell Biol*, 14 (5):3074-3084.
- Shaulsky G, Escalante R, Loomis WF.** 1996. Developmental signal transduction pathways uncovered by genetic suppressors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (26):15260-15265.
- Simpson AG, Roger AJ.** 2004. The real 'kingdoms' of eukaryotes. *Curr Biol*, 14 (17):R693-696.
- Siol O, Spaller T, Schiefner J, Winckler T.** 2011. Genetically tagged TRE5-A retrotransposons reveal high amplification rates and authentic target site preference in the *Dictyostelium discoideum* genome. *Nucleic Acids Res*, 39 (15):6608-6619.
- Siol O, Boutliliss M, Chung T, Glöckner G, Dingermann T, Winckler T.** 2006. Role of RNA polymerase III transcription factors in the selection of integration sites by the *dictyostelium* non-long terminal repeat retrotransposon TRE5-A. *Mol Cell Biol*, 26 (22):8242-8251.
- Skalka AM, Goff SP.** 1993. Reverse transcriptase. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Slotkin RK, Martienssen R.** 2007. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat Rev Genet*, 8 (4):272-285.
- Smothers JF, Henikoff S.** 2000. The HP1 chromo shadow domain binds a consensus peptide pentamer. *Curr Biol*, 10 (1):27-30.
- Spaller T.** 2015. Untersuchungen zu positionsspezifisch integrierenden Retrotransposons in sozialen Amöben. *Friedrich-Schiller Universität, Jena*, Dissertation.
- Spaller T, Kling E, Glöckner G, Hillmann F, Winckler T.** 2016. Convergent evolution of tRNA gene targeting preferences in compact genomes. *Mob DNA*, 7 (1):17.
- Steele SJ, Levin HL.** 1998. A map of interactions between the proteins of a retrotransposon. *J Virol*, 72 (11):9318-9322.
- Strahl BD, Allis CD.** 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403 (6765):41-45.
- Sultana T, Zamborlini A, Cristofari G, Lesage P.** 2017. Integration site selection by retroviruses and transposable elements in eukaryotes. *Nat Rev Genet*, 18 (5):292-308.
- Sun C, Shepard DB, Chong RA, Lopez Arriaza J, Hall K, Castoe TA, Feschotte C, Pollock DD, Mueller RL.** 2012. LTR retrotransposons contribute to genomic gigantism in plethodontid salamanders. *Genome Biol Evol*, 4 (2):168-183.

- Sussman S.** 1967. Cultivation of *Dictyostelium discoideum* in axenic medium.
- Sutoh K.** 1993. A transformation vector for dictyostelium discoideum with a new selectable marker bsr. *Plasmid*, 30 (2):150-154.
- Swergold GD.** 1990. Identification, characterization, and cell specificity of a human LINE-1 promoter. *Mol Cell Biol*, 10 (12):6718-6729.
- Szafranski K, Glöckner G, Dingermann T, Dannat K, Noegel AA, Eichinger L, Rosenthal A, Winckler T.** 1999. Non-LTR retrotransposons with unique integration preferences downstream of Dictyostelium discoideum tRNA genes. *Mol Gen Genet*, 262 (4-5):772-780.
- Tasara T, Maga G, Hottiger MO, Hubscher U.** 2001. HIV-1 reverse transcriptase and integrase enzymes physically interact and inhibit each other. *FEBS Lett*, 507 (1):39-44.
- Taverna SD, Li H, Ruthenburg AJ, Allis CD, Patel DJ.** 2007. How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat Struct Mol Biol*, 14 (11):1025-1040.
- Turowski TW, Tollervey D.** 2016. Transcription by RNA polymerase III: insights into mechanism and regulation. *Biochem Soc Trans*, 44 (5):1367-1375.
- van Gent DC, Vink C, Groeneger AA, Plasterk RH.** 1993. Complementation between HIV integrase proteins mutated in different domains. *EMBO J*, 12 (8):3261-3267.
- Veltman DM, Akar G, Bosgraaf L, Van Haastert PJ.** 2009. A new set of small, extrachromosomal expression vectors for Dictyostelium discoideum. *Plasmid*, 61 (2):110-118.
- Wang JY, Ling H, Yang W, Craigie R.** 2001. Structure of a two-domain fragment of HIV-1 integrase: implications for domain organization in the intact protein. *EMBO J*, 20 (24):7333-7343.
- Watts DJ, Ashworth JM.** 1970. Growth of myxameobae of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum in axenic culture. *Biochem J*, 119 (2):171-174.
- West CM.** 2003. Comparative analysis of spore coat formation, structure, and function in Dictyostelium. *Int Rev Cytol*, 222:237-293.
- Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, Chalhoub B, Flavell A, Leroy P, Morgante M, Panaud O, Paux E, SanMiguel P, Schulman AH.** 2007. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev Genet*, 8 (12):973-982.
- Wiegand S, Meier D, Seehafer C, Malicki M, Hofmann P, Schmith A, Winckler T, Foldesi B, Boesler B, Nellen W, Reimegard J, Kaller M, Hallman J, Emanuelsson O, Aveson L, Soderbom F, Hammann C.** 2013. The Dictyostelium discoideum RNA-dependent RNA polymerase RrpC silences the centromeric retrotransposon DIRS-1 post-transcriptionally and is required for the spreading of RNA silencing signals. *Nucleic Acids Res*, 42 (5):3330-3345.
- Wilhelm M, Wilhelm FX.** 2001. Reverse transcription of retroviruses and LTR retrotransposons. *Cell Mol Life Sci*, 58 (9):1246-1262.
- Winckler T.** 1998. Retrotransposable elements in the Dictyostelium discoideum genome. *Cell Mol Life Sci*, 54 (5):383-393.

- Winckler T, Dingermann T, Glöckner G.** 2002. Dictyostelium mobile elements: strategies to amplify in a compact genome. *Cell Mol Life Sci*, 59 (12):2097-2111.
- Winckler T, Szafranski K, Glöckner G.** 2005. Transfer RNA gene-targeted integration: an adaptation of retrotransposable elements to survive in the compact Dictyostelium discoideum genome. *Cytogenet Genome Res*, 110 (1-4):288-298.
- Winckler T, Schiefner J, Spaller T, Siol O.** 2011. Dictyostelium transfer RNA gene-targeting retrotransposons: Studying mobile element-host interactions in a compact genome. *Mob Genet Elements*, 1 (2):145-150.
- Wu CC, Lin YC, Chen HT.** 2011. The TFIIF-like Rpc37/53 dimer lies at the center of a protein network to connect TFIIC, Bdp1, and the RNA polymerase III active center. *Mol Cell Biol*, 31 (13):2715-2728.
- Wu R, Terry AV, Singh PB, Gilbert DM.** 2005. Differential subnuclear localization and replication timing of histone H3 lysine 9 methylation states. *Mol Biol Cell*, 16 (6):2872-2881.
- Xie W, Gai X, Zhu Y, Zappulla DC, Sternglanz R, Voytas DF.** 2001. Targeting of the yeast Ty5 retrotransposon to silent chromatin is mediated by interactions between integrase and Sir4p. *Mol Cell Biol*, 21 (19):6606-6614.
- Xiong Y, Eickbush TH.** 1988. The site-specific ribosomal DNA insertion element R1Bm belongs to a class of non-long-terminal-repeat retrotransposons. *Mol Cell Biol*, 8 (1):114-123.
- Xiong Y, Eickbush TH.** 1990. Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *EMBO J*, 9 (10):3353-3362.
- Yieh L, Kassavetis G, Geiduschek EP, Sandmeyer SB.** 2000. The Brf and TATA-binding protein subunits of the RNA polymerase III transcription factor IIIB mediate position-specific integration of the gypsy-like element, Ty3. *J Biol Chem*, 275 (38):29800-29807.
- Yieh L, Hatzis H, Kassavetis G, Sandmeyer SB.** 2002. Mutational analysis of the transcription factor IIIB-DNA target of Ty3 retroelement integration. *J Biol Chem*, 277 (29):25920-25928.
- Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH.** 1997. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet*, 13 (8):335-340.
- Zaratiegui M.** 2013. Influence of long terminal repeat retrotransposons in the genomes of fission yeasts. *Biochem Soc Trans*, 41 (6):1629-1633.
- Zarebski M, Wiernasz E, Dobrucki JW.** 2009. Recruitment of heterochromatin protein 1 to DNA repair sites. *Cytometry A*, 75 (7):619-625.
- Zeytuni N, Zarivach R.** 2012. Structural and functional discussion of the tetra-trico-peptide repeat, a protein interaction module. *Structure*, 20 (3):397-405.
- Zhao T, Heyduk T, Allis CD, Eissenberg JC.** 2000. Heterochromatin protein 1 binds to nucleosomes and DNA in vitro. *J Biol Chem*, 275 (36):28332-28338.
- Zmasek CM, Godzik A.** 2012. This Deja vu feeling--analysis of multidomain protein evolution in eukaryotic genomes. *PLoS Comput Biol*, 8 (11):e1002701.
- Zuker C, Cappello J, Chisholm RL, Lodish HF.** 1983. A repetitive Dictyostelium gene family that is induced during differentiation and by heat shock. *Cell*, 34 (3):997-1005.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------|--|
| AS | Aminosäure |
| Bdp1 | <i>B-double-prime 1</i> |
| bp | Basenpaare |
| Brf1 | <i>B-related-factor</i> |
| bsr | Blasticidin |
| cAMP | cyclisches Adenosinmonophosphat |
| CCD | <i>catalytic core domain</i> |
| cDNA | <i>complementary DNA</i> |
| CTD | <i>C-terminal domain</i> |
| Da | Dalton |
| Dd | <i>Dictyostelium discoideum</i> |
| DGLT-A | <i>Dictyostelium gypsy like</i> Transposon-A |
| DGLT-A ^{bsr} | Artifizielles DGLT-A mit Blasticidin-Resistenzkassette |
| DIRS-1 | <i>Dictyostelium intermediate repeat sequence-1</i> |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| gag | <i>group specific antigen</i> |
| HRP | <i>horseraddish peroxydase</i> |
| H3R | <i>Hind3-repeat</i> |
| IN | Integrase |
| kb | Kilobasenpaare |
| kDa | Kilo-Dalton |
| LTR | <i>long terminal repeats</i> |
| mRNA | Messenger RNA |
| min | Minuten |
| ORF | <i>open reading frame</i> |
| PBS | <i>primer binding site</i> |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> |
| POL | Polyprotein |
| POLII oder III | RNA-Polymerase II oder III |
| PPT/U | <i>Polypurine tract</i> (Polypurin-Bindestelle) |

| | |
|------------------|---|
| PPY | Polypyrimidin-Bindestelle |
| rDNA | Ribosomale Desoxyribonukleinsäure |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNH | Ribonuklease H |
| rpm | <i>rounds per minute</i> |
| sec | Sekunden |
| RT | Reverse Transkriptase |
| TBP | TATA-Box-Bindeprotein |
| Tfc1/Tfc4 | Untereinheiten des TFIIC-Komplexes |
| TPR | <i>tetratricopeptid repeats</i> |
| TPRT-Mechanismus | <i>target primed reverse transcription</i> -Mechanismus |
| TRE | <i>tRNA gene targeted retroelement</i> |
| tRNA | <i>transfer</i> RNA |
| TSD | <i>target site duplication</i> |
| Ty | <i>Transposon of yeast</i> |
| YR | Tyrosin-Rekombinase-Retrotransposons |

8.2 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Integrationsmechanismen von Retrotransposons und DNA-Transposons | 9 |
| Abbildung 2: Mechanismus der Transposition von DNA-Transposons..... | 10 |
| Abbildung 3: Schematischer Aufbau der LINE- und SINE-Elemente | 12 |
| Abbildung 4: Non-LTR-Retrotranspositionsmechanismus | 13 |
| Abbildung 5: Struktur und phylogenetische Einordnung der LTR-Retrotransposons | 15 |
| Abbildung 6: LTR-Retrotranspositionsmechanismus..... | 17 |
| Abbildung 7: Strukturen der Ty-Elemente von <i>S. cerevisiae</i> | 18 |
| Abbildung 8: Vereinfachte Darstellung der Evolution der Eukaryoten und Darstellung der phylogenetischen Position von <i>D. discoideum</i> | 20 |
| Abbildung 9: Lebenszyklus der sozialen Amöbe <i>Dictyostelium discoideum</i> | 22 |
| Abbildung 10: Überblick über die transposablen Elemente im Genom von <i>D. discoideum</i> | 23 |
| Abbildung 11: Schematische Darstellung der TRE-Elemente aus <i>D. discoideum</i> | 24 |
| Abbildung 12: Schematische Darstellung des DIRS-1-Elements aus <i>D. discoideum</i> | 25 |
| Abbildung 13: Schematische Darstellung des Skipper-1-Elements aus <i>D. discoideum</i> | 26 |
| Abbildung 14: Schematische Darstellung des DGLT-A-Elements aus <i>D. discoideum</i> | 28 |
| Abbildung 15: Integrationspräferenz der Non-LTR-Retrotransposons L1 und R2..... | 30 |
| Abbildung 16: Integrationspräferenz von transposablen Elementen vor RNA-Pol II transkribierte Gene | 31 |
| Abbildung 17: Integrationspräferenz von Ty5 aus <i>S. cerevisiae</i> und Chromoviren..... | 33 |
| Abbildung 18: Präinitiationskomplex der RNA-Polymerase III an tRNA-Genen | 34 |
| Abbildung 19: Integrationspräferenzen der mobilen Elemente aus <i>S. cerevisiae</i> und <i>D. discoideum</i> | 37 |
| Abbildung 20: Topologie des Präinitiationskomplexes der RNA-Polymerase III und schematische Darstellung der LTR-Retrotransposons DGLT-A und Ty3 | 63 |
| Abbildung 21: Alignment der RT-RNH-Domänen von DGLT-A und Ty3..... | 64 |
| Abbildung 22: Schematische Darstellung von DGLT-A mit Aminosäurepositionen der einzelnen Domänen des Polyproteins..... | 65 |
| Abbildung 23: RT-RNH-Domänen von Ty3 und DGLT-A im Vergleich..... | 67 |
| Abbildung 24: Alignment zwischen der Integrase-Domäne von Ty3 und DGLT-A | 68 |
| Abbildung 25: Vergleich der Strukturen der zentralen TPRs 1-10 von Tfc4 aus <i>S. cerevisiae</i> und <i>D. discoideum</i> | 70 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 26: Strukturbasiertes Alignment der TPRs 1-10 aus Tfc4 zwischen <i>D. discoideum</i> und <i>S. cerevisiae</i> | 72 |
| Abbildung 27: Interaktionen zwischen Tfc4 (446-608) und funktionellen Domänen des Polyproteins von DGLT-A | 73 |
| Abbildung 28: Interaktionsanalysen zwischen Tfc4 (TPRs 7-10) und DGLT-A-RNH | 75 |
| Abbildung 29: Interaktionsanalyse zwischen TPR 7 und TPR 8 gegen DGLT-A RNH-Fragmente | 76 |
| Abbildung 30: <i>Pulldown</i> -Experiment zwischen Tfc4 und RNH | 78 |
| Abbildung 31: Interaktionsanalysen innerhalb der DGLT-A-RNH-Domäne | 79 |
| Abbildung 32: Interaktionsanalysen zwischen Tfc4 und DGLT-A-Integrase | 81 |
| Abbildung 33: <i>Pulldown</i> -Experiment zwischen Tfc4 und IN-NED | 82 |
| Abbildung 34: Interaktionsanalysen zwischen DGLT-A-IN und RT-RNH-Domänen | 84 |
| Abbildung 35: Interaktionsanalyse zwischen IN-NED und RNH-Domäne von DGLT-A | 85 |
| Abbildung 36: Interaktionsanalysen innerhalb der Integrase-Domäne von DGLT-A | 86 |
| Abbildung 37: Interaktionsanalyse zwischen DGLT-A-Integrase und der erweiterten N-terminalen Domäne IN-NED | 87 |
| Abbildung 38: Analyse der Interaktionsflächen der RNH-Domäne von DGLT-A | 89 |
| Abbildung 39: Tfc4 (TPRs 7-10) von <i>D. discoideum</i> mit aufgezeigten Mutationen | 90 |
| Abbildung 40: Interaktionsanalyse zwischen Wildtyp und mutierten TPRs 7-10 aus dem <i>D. discoideum</i> -Tfc4 gegen RNH und IN-NTD | 91 |
| Abbildung 41: TRE5-A-Retrotranspositionstest nach Siol <i>et al.</i> 2011 | 94 |
| Abbildung 42: Darstellung der invertierten Blasticidin-Resistenzkassette inklusive Intron | 95 |
| Abbildung 43: Klonierungsstrategie für das genetisch markierte Retrotransposon DGLT-A... | 97 |
| Abbildung 44: Nachweis der Mobilisierung des genetisch markierten DGLT-A ^{bsr} | 98 |
| Abbildung 45: Nachweis der Retrotransposition von DGLT-A ^{bsr} | 100 |
| Abbildung 46: Analyse der Transkripte von DGLT-A ^{bsr} mittels RT-PCR | 102 |
| Abbildung 47: Schematische Darstellung der LTR-Retrotransposons DGLT-A und Skipper-1 | 103 |
| Abbildung 48: Klonierungsstrategie für das genetisch markierte Retrotransposon Skipper-1 | 104 |
| Abbildung 49: Nachweis der Mobilisierung des genetisch markierten Skipper-1 ^{bsr} | 105 |
| Abbildung 50: Analyse der Transkripte von Skipper-1 ^{bsr} mittels RT-PCR | 106 |
| Abbildung 51: Phylogenie der LTR-Retrotransposons aus Dictyosteliden | 108 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 52: Alignment der Chromodomäne verschiedener Skipper-Retrotransposons aus Dictyosteliden | 109 |
| Abbildung 53: Peptid-Protein- <i>Pulldown</i> zwischen Skipper-1-CHD und methyliertem, modifiziertem H3a | 111 |
| Abbildung 54: Expression von HcpA-mRFPmars in AX2 | 113 |
| Abbildung 55: Expression von GFP-Skipper1-CHD und HcpA-mRFPmars in AX2 | 114 |
| Abbildung 56: Expression von GFP-Skipper1-IN-CHD und HcpA-mRFPmars in AX2 | 115 |
| Abbildung 57: Expression von GFP-Skipper-1 und HcpA-mRFPmars in AX2 | 116 |
| Abbildung 58: Gefundene Proteininteraktion zwischen RNH, Integrase und Tfc4 in <i>D. discoideum</i> für die zielgerichtete Integration von DGLT-A | 119 |
| Abbildung 59: Strukturmodell der TPRs 7 und 8 aus Tfc4 von <i>D. discoideum</i> mit DL-Motiv . | 121 |
| Abbildung 60: Strukturmodell eines RT-RNH-Dimers aus Ty3 inklusive RNA-DNA-Hybrid.... | 123 |
| Abbildung 61: Modell zur zielgerichteten Integration von Ty3..... | 126 |
| Abbildung 62: Modell zur zielgerichteten Integration von DGLT-A | 127 |
| Abbildung 63: Schematische Darstellung der Anreicherung von DGLT-A ^{bsr} | 132 |

8.3 Tabellenverzeichnis

| | | |
|-------------|---|-----|
| Tabelle 1: | Zusammensetzung E50-Puffer..... | 46 |
| Tabelle 2: | Zusammensetzung Phosphatpuffer | 47 |
| Tabelle 3: | Komponenten zur Isolation genomischer DNA - Schnellpräparation | 48 |
| Tabelle 4: | Komponenten zur Isolation von genomischer DNA - hoher Reinheit..... | 49 |
| Tabelle 5: | Zusammensetzung der Färbelösung | 51 |
| Tabelle 6: | Zusammensetzung der Coomassie-Lösung..... | 52 |
| Tabelle 7: | Zusammensetzung der Puffer zur Proteinaufreinigung | 53 |
| Tabelle 8: | Zusammensetzung der Puffer zum Protein-Protein- <i>Pulldown</i> | 54 |
| Tabelle 9: | Zusammensetzung der Puffer zum Peptid-Protein- <i>Pulldown</i> | 55 |
| Tabelle 10: | Zusammensetzung der Puffer für die SDS-PAGE | 56 |
| Tabelle 11: | Zusammensetzung der Puffer für den Western Blot..... | 56 |
| Tabelle 12: | Verdünnung der Antikörper | 57 |
| Tabelle 13: | Zusammensetzung der Lösungen zur Herstellung kompetenter Hefezellen (AH109)..... | 58 |
| Tabelle 14: | Zusammensetzung der Lösungen zur Transformation von Hefezellen (AH109)..... | 58 |
| Tabelle 15: | Zusammensetzung des Puffers zur Isolation von Plasmid-DNA aus Hefezellen..... | 59 |
| Tabelle 16: | Auflistung der verwendeten Peptide für den <i>Pulldown</i> | 110 |
| Tabelle 17: | Auflistung verwendeter Oligonukleotide..... | 161 |
| Tabelle 18: | Auflistung der hergestellten Plasmide | 163 |
| Tabelle 19: | Auflistung zusätzlich verwendeter Plasmide | 167 |

8.4 Verwendete Oligonukleotide

Tabelle 17: Auflistung verwendeter Oligonukleotide

| Name | Sequenz |
|----------------------|--|
| bsr-19 | GGATCAATTTAACATTTCTCAAC |
| bsr-test-02 | GTTCTTCAATCGTAGTTTTGAC |
| DGLT-A(759-891)-01 | CCATGGGTCTAGGTTAAGTTTTCCACAAGATACAGATGA |
| DGLTA(733-800)-01 | CCATGGGTGTTAATTTCAAATGGACTGATG |
| DGLTA(733-800)-02 | GGATCCTAAGCGTTGTTTAATGTTCTTG |
| DGLTA(733-879)-02 | GGATCCTATAATGCATCAGCTAAAAAGTTTTCTTTAC |
| DGLT-A(1032-1067)-01 | CCATGGACAATGCACAAGCAGCAAGAAGAA |
| DGLT-A(1032-1067)-02 | GGATCCTAAGATTTCTTACTTGATAAAGTATG |
| DGLTA(733-761)-02 | GGATCCTAAAACTTAAAAAGATTAGTTTGTGCTA |
| DGLT-A(733-891)-01 | CCATGGGTCTAGGGTTAATTTCAAATGGACTGATGAATTG |
| DGLT-A(733-891)-02 | GGATCCTTACCTAGGATCACAATCAATTGGCTGTTGATCTC |
| DGLTA(763-846)-01 | CCATGGGTCAAGATACAGATGATAATGTTATTGAA |
| DGLTA(801-846)-02 | GGATCCTATTTACCAGTTAAGAGATATTTTC |
| DGLT-A(994-1033)-01 | CCATGGATAATATTAATACAACAACCTCCACAA |
| DGLT-A(994-1033)-02 | GGATCCTAATTGTCTGGAAGTCTGTTTCTTC |
| DGLTA(994-1147)-02 | GGATCCTAAATTGGAATGAGTAAACCTTCTTTTG |
| DGLT-A-01q | CAAAATGTTTCAGCAGTTGATATTTTC |
| DGLT-A-02q | GAATTGAACCATCTTCACAAGACTTTG |
| DGLTA-48bio | 5'-Biotin-GCATTGTAATCTTCTCTGTCGCTACTTC |
| DGLTA-49 | GTATTTATATTATTCATAATGAGTTGAC |
| DGLT-Absr_neu-01 | ACCGGTGGAAAGGGTTTATCATTTTCG |
| DGLT-Absr_neu-02 | CTTTGAATTTTTCGAATAATAGTTTGAC |
| DGLT-Absr_neu-03 | CTATTATTCGAAAAATTCAAAGAAAAAGG |
| DGLT-Absr_neu-04 | CATATCCACCGGTTTTAGTTGAAAATTTTTTTC |
| DGLT-Absr_neu-05 | GTAGTCTTACCATCATTTGGG |
| DGLT-Absr_neu-06 | GCATTACATAATCCAAATGGC |
| DpRNH-01 | CCATGGGTAATATTGAATTTGAATGGACATCCG |
| DpRNH-02 | GGATCCTTATAATAAATCAGCAAAATAATTAACCTTACC |
| DpTFC4-01 | CCATGGTGGATATGTTGTCCAATGTTATTGTC |
| DpTFC4-02 | GGATCCTTAAATTTTTCCCTTTTGTATTCCAATTC |
| EK-01 | CCATGGGTCAACCATCATCACCACCACAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC |

| Name | Sequenz |
|----------------------|---|
| EK-02 | CAAGAAAGGAGGAGGAGGGCGGCC |
| EK-03 | CAAGCTTCCGGCGTGAACCTCAAGTGGAC |
| EK-04 | CCATGGGTCACCATCATCACCACCACGACTACAAAGATGATGACGACAAG |
| GFP-pDM358 | CAAAGTGCTTTGAGTAAGGATC |
| gpdA-qRT-01 | GTACCACCAATTGTTTAGCTCCATTAGC |
| gpdA-qRT-02 | GTCAGATTGAGAGGCAGCTTTCATGACC |
| HcpA-01 | CAGATCTAAAAAATGGGATCTGGAAAAAGAGATAAGAGAATAATAG |
| HcpA-02 | ACTAGTACTTTGTTGACCCTTATAACCAAATTTAAG |
| HcpA-test-rev | CAACATTATCTTCATCTTCCC |
| his6-GFP-01 | CCATGGGTCACCATCATCACCACCACAGTAAAGGAGAAGAACTTTTTAC |
| his6-LtGFP-01 | CCATGGGTCACCATCATCACCACCACAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCCACC |
| his6-LtGFP-02 | GCGGCCGCTTACTTGTATAGCTCGTCCATGC |
| IN_NTD1_1.1_for | GTGTAAATTGTGGAGTTGTTG |
| IN_NTD1_1.2_for | CTTGCTGCTTGTGCATTGTCC |
| LEXSY-NTD-01 | AAGCTTTAAATATTAATACAACAACCTCCACAATTTAC |
| LEXSY-NTD-02 | GCGGCCGCTAAATTGGAATGAGTAAACCTTCTT |
| mRFPmars-for | GGTGAAGGTAGACCATATGAAGG |
| mRFPmars-rev | AACTTCTGCATCATAATGACCACC |
| NTD.2-01 | CCATGGGTCATTTTAAACATCTTCAAATTGTAGTTC |
| PpTfc4(416-574)-01 | CCATGGTTGCACCGGACTTGGTGTATAGTGC |
| PpTfc4(416-574)-02 | GGATCCTATAAACGTTTGGATTCTAAATCATTAAAG |
| RFP-RedStar-for | GAGGGTAGACCATATGAAGG |
| RFP-RedStar-rev | GAAGCTTCCCAACCCATAG |
| RFP-test-for | ACTATGGGTTGGGAAGC |
| RNH759-889_pDM448-01 | GGTACCAAAAAGAAAAGAAAATTAAGTTTTCCACAAGATACAGATG |
| RNH759-889_pDM448-02 | TTAATCAATTGGCTGTTGATCTCTATCTG |
| RNH 733-879-02 | GGATCCTATAATGCATCAGCTAAAAAGTTTTCTTTAC |
| Q-skipper-07 | CTCAATTATTGTTGAATCATGTGTTTCAG |
| Skipper-01 | GATATTTCTTGGTGATTAGTTG |
| Skipper-02_AgeI | ACCGGTCTATAAACTCTTGGGTGTAAC |
| Skipper-03 | CTGCAGTCCACCTCTGAGCCATAGC |
| Skipper-04 | CAACTCATCTCCAAACCCAAC |
| Skipper-NotI_rev | GCGGCCGCCAACTCATCTCCAAACCCAAC |

| Name | Sequenz |
|-------------------|---|
| Skipper-01q | GATGTATCCGACGTCGAAGTCAGAGAG |
| Skipper-02q | CAAGGTTGGTTCAACACCATTCTGGG |
| Skipper-IN_CHD-03 | GGAATTCGAGAAGAAGAAAAGTCGTAAGCGTAA GAATATATTAATACTAAAGCCTCAACAGAGTATG |
| Skipper-IN_CHD-04 | GAATTCCTATAAACTCTTGGGTGTAACCTTTC |
| Skipper-IN_NTD-01 | GCAATTGGAGAAGAAGAAAAGTCGTAAGCGTAA AATATATTAATACTAAAGCCTCAACAGAGTATG |
| Skipper-IN_NTD-02 | CAATTGCTATAAACTCTTGGGTGTAACCTTTC |
| TPR7_co-01 | CCATGGGTAACGACTCTGAAGTTCC |
| TPR7_co-02 | GGATCCTTACAATGGCAACAATCTCAAGTGCAAC |
| TPR8-01 | CCATGGGTTTGGACCATCTGAATACGGTG |
| TPR8-02 | GGATCCTTAGTTAGATGGGATGTCGAAGTCAG |

8.5 Hergestellte und verwendete Plasmide

Nachfolgend sind die Plasmide aufgelistet, die während dieser Arbeit hergestellt und verwendet wurden. Die dahinter aufgeführten Nummern beziehen sich auf die Datenbank des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie, in der alle Plasmid-Daten gespeichert sind.

8.5.1 Hergestellte Plasmide

Tabelle 18: Auflistung der hergestellten Plasmide

| Plasmid Name | Plasmid-Nr. | Klonierung |
|------------------------------------|-------------|---|
| Plasmide für das Y2H-System | | |
| pGBKT7-PpTFC4(416-573)co | 20953 | mit Nco/Bam aus 20952 ausgeschnitten und in pGBKT7 ligiert |
| pGBKT7-TPR78910-Mutante | 20949 | mit Nco/Bam aus 20948 ausgeschnitten und in 11255 ligiert |
| pGBKT7-RNH(759-879) | 20929 | mit Nco/Bam aus 20848 geschnitten und in 11255 ligiert |
| pGBKT7-TPR_8 | 20913 | aus 20912 mit Nco/ Bam geschnitten und in pGBKT7 ligiert |
| pGBKT7-TPR_7 | 20901 | aus 20900 mit Nco/Bam ausgeschnitten und in pGBKT7 ligiert |
| pGBKT7-TPR7_8_9_10_co | 20897 | aus 20896 mit Nco/Bam ausgeschnitten und in pGBKT7 ligiert |
| pGBKT7-DGLTA-IN-NTD2(1067-1147) | 20895 | mit Nco/Bam aus 20893 ausgeschnitten und in pGBKT7 liegiert |
| pGBKT7_TPR7_8_9_co | 20892 | mit Nco und Bam aus 20889 geschnitten und in 11255 |
| pGBKT7_TPR8_9_co | 20891 | mit Nco und Bam aus 20888 geschnitten und in 11255 |

| Plasmid Name | Plasmid-Nr. | Klonierung |
|---|-------------|---|
| pGBKT7_TPR7_8_co | 20890 | mit Nco und Bam aus 20887 geschnitten und in 11255 |
| pGBKT7_Dp_DGLTA_RNH(741-886) | 20835 | mit Nco/ BamHI aus 20825 in pGBKT7 (11255) |
| pGBKT7_Dp_DGLTA_TFC4(408-572) | 20833 | mit Nco/ BamHI aus 20826 in pGBKT7 (11255) |
| pGBKT7-DGLTA (IN-NTD.1-2) | 20782 | kloniert aus 20768 mit NcoI und BamHI in 11255 |
| pGBKT7-DGLTA (IN-NTD.1-1) | 20781 | kloniert aus 20767 mit NcoI und BamHI in 11255 |
| pAct-DGLTA-IN-NTD2(1067-1147) | 20894 | aus 20893 mit Nco/Bam ausgeschnitten und in pAct ligiert |
| pAct-RNH759-879sc(EKE) | 20860 | mit NcoI/ BamHI ausgeschnitten und in 20112 |
| pAct-RNH(759-879)sc | 20859 | mit NcoI/ BamHI ausgeschnitten und in 20112 |
| pAct2_DGLTA(RNH 759-879) | 20848 | mit Nco/ BamHI aus 20844 in pAct (20112) |
| pAct2_DGLTA(RNH 759-846) | 20847 | mit Nco/ BamHI aus 20843 in pAct (20112) |
| pAct2_DGLTA(RNH 759-891) | 20846 | mit Nco/ BamHI aus 20842 in pAct (20112) |
| pAct2_DGLTA(RNH 733-891) | 20845 | mit Nco/ BamHI aus 20841 in pAct (20112) |
| pAct_Dp_DGLTA_RNH(741-886) | 20834 | mit Nco/ BamHI aus 20825 in pAct (20112) |
| pAct_Dp_DGLTA_TFC4(408-572) | 20832 | mit Nco/ BamHI aus 20826 in pAct (20112) |
| pAct2_DGLTA(RNH 769-846) | 20812 | kloniert aus 20810 mit NcoI und BamHI in 20112 |
| pAct2_DGLTA(RNH 733-761) | 20811 | kloniert aus 20809 mit NcoI und BamHI in 20112 |
| pAct-DGLTA(RNH 801-884) | 20799 | kloniert aus 20764 mit NcoI und BamHI in 20112 (pAct) |
| pAct-DGLTA (IN-NTD.1-2) | 20784 | kloniert aus 20768 mit NcoI und BamHI in 20112 |
| pAct-DGLTA (IN-NTD.1-1) | 20783 | kloniert aus 20767 mit NcoI und BamHI in 20112 |
| Expressionsplasmide für <i>D. discoideum</i> | | |
| pDM304-GFP-Dd-Skipper1 | 20951 | Plasmid von Hammann AG |
| pDM304-Dd-Skipper1-GFP | 20950 | Plasmid von Hammann AG |
| pDM324-HcpA-RFP | 20947 | aus 20944 mit BglII/ SpeI in 20924 (pDM324) ligiert |
| pDM326_GFPcoDD-Skipper1-CHD | 20930 | mit BglII / SpeI aus 20898 in pDM326 (20582) |
| pDM358_GFPcoDD-Skipper1-IN-CHD-EG241-EcoRI | 20926 | mit EcoRI aus 20911 geschnitten. In 20902 ligiert, welcher mit MfeI geschnitten wurde |
| pDM358_GFPcoDD-Skipper1-CHD | 20902 | aus 20898 mit BglII/ SpeI geschnitten und in pDM358 (20831) ligiert |
| pDM448-RNH759-889 | 20878 | aus 20877 in 20540 |
| pDM358-TT_RNH759-889 | 20861 | mit BglII/ SpeI aus 20852 ausgeschnitten und in 20831 eingefügt |

| Plasmid Name | Plasmid-Nr. | Klonierung |
|--|-------------|---|
| DGLT-A^{bsr}-Element | | |
| pGEMT-DGLTA_bsr_neu | 20943 | beide ORFs von DGLT-A mit authentischem 5' Ende und BSR-Kassette + 3' LTR |
| pGEMT-F5_DGLTA_bsr_neu | 20942 | beide ORFs von DGLT-A mit authentischem 5' Ende |
| pGEMT-F4_DGLTA_bsr_neu | 20934 | 5' Ende von DGLT-A mit H3R und Anfang ORF bis BglII-Schnittstelle; davor SphI-Schnittstelle |
| pGEMT-F3_DGLTA_bsr_neu | 20905 | Fragment 3 für neues BSR-markiertes DGLT-A; beide ORFs von DGLT-A |
| pGEMT-F2_DGLTA_bsr_neu | 20904 | Fragment 2 für neues BSR-markiertes DGLT-A |
| pGEMT-F1_DGLTA_bsr_neu | 20903 | Fragment 1 für neues BSR-markiertes DGLT-A |
| Expressionsplasmide für E. coli | | |
| pET33_his6_GFP_NTDco(994-1147) | 20928 | als HindIII / NotI Fragment aus 20925 geschnitten und in 20806 ligiert |
| pET33_his6_Flag_NTD(994-1147) | 20910 | als HindIII Not-Fragment aus 20908 in 20803 |
| pET33_his6_GFP_NTD(994-1147) | 20909 | als HindIII Not-Fragment aus 20908 in 20806 |
| pET33b-GFPcoDD-Skipper1-CHD | 20899 | aus 20898 mit Nco/Not ausgeschnitten und in pET33b ligiert |
| pET33b_his6_Flag_NTD1(994-1067) | 20876 | NTD1-Teil aus Lexsy-Plasmid (20653) mit HindIII und NotI ausgeschnitten und in 20803 |
| pET33b_his6_GFP_NTD1(994-1067) | 20875 | NTD1-Teil aus Lexsy-Plasmid (20653) mit HindIII und NotI ausgeschnitten und in 20806 |
| pET33b_his6_GFP_Lt | 20817 | als Nco / Not - Fragment aus 20816 in pET33b (20103) |
| pET33b_his6_GFP_RNH(733-884) | 20807 | als HindIII / NotI -Fragment aus pGEMT-RNH(733-884) (20801) in pET33b_his6_GFP_TFC4(446-608) (20806) |
| pET33b_his6_GFP_TFC4(446-608) | 20806 | als NcoI / NotI -Fragment aus pGEMT_his6_GFP_TFC4(446-608) (20802) in pET33b (20103) |
| pET33b_his6_Flag_RNH(733-884) | 20804 | als HindIII / NotI -Fragment aus pGEMT-RNH(733-884) (20801) in pET33b_his6_Flag_TFC4(446-608) (20803) |
| pET33b_his6_Flag_TFC4(446-608) | 20803 | als NcoI / NotI -Fragment aus pGEMT_his6_Flag_TFC4(446-608) (20800) in pET33b (20103) |
| Subklonierungen | | |
| pGEMT-HcpA | 20944 | PCR an gDNA mit HcpA-01 und HcpA-02 |
| pGEMT-DGLTA-RNH(759-800) | 20938 | PCR an 20774 mit DGLTA(759-891)-01 und DGLTA(733-800)-02 |
| pGEMT-Skipper1-IN-CHD-EcoRI | 20937 | PCR an 20936 mit Skipper-IN_CHD-03 und Skipper-IN_CHD-04 |
| pGEMT-Skipper1-Q7-NotIrev | 20936 | PCR an Dd-gDNA mit Q-skipper-07 und Skipper-NotI_rev |
| pGEMT-TPR_8 | 20912 | PCR mit TPR8-01 und TPR8-02 an 20897 |
| pGEMT_GFPcoDD-Skipper1-IN- | 20911 | PCR an 20886 mit Skipper-IN_CHD-03 und |

| Plasmid Name | Plasmid-Nr. | Klonierung |
|--|-------------|---|
| CHD-EG241-EcoRI | | Skipper-IN_CHD-04 |
| pGEMT-HindIII-NTD-NotI | 20908 | PCR mit LEXSY-NTD-01 und LEXSY-NTD-02 an pAct-NTD (20746) |
| pGEMT_GFPcoDD-Skipper1-IN-CHD-EG241-MfeI | 20907 | PCR an 20886 mit Skipper-IN_NTD-01 und Skipper-IN_NTD-02 |
| pGEMT-TPR_7 | 20900 | PCR mit TPR7_co_01 und TPR_co_02 an 20889 |
| pGEMT-DGLTA-IN-NTD2(1067-1147) | 20893 | PCR mit NTD2-01 und DGLTA(994-1147)-02 an 20428 |
| pGEMT_DGLTA(RNH 759-879) | 20844 | PCR an 20423 mit Primern DGLT-A(759-891)-01 und RNH 733-879_02 |
| pGEMT_DGLTA(RNH 759-846) | 20843 | PCR an 20423 mit Primern DGLT-A(759-891)-01 und DGLTA(801-846)-02 |
| pGEMT_DGLTA(RNH 759-891) | 20842 | PCR an 20423 mit Primern DGLT-A(759-891)-01 und DGLT-A(733-891)-02 |
| pGEMT_DGLTA(RNH 733-891) | 20841 | PCR an 20423 mit Primern DGLT-A(733-891)-01 und DGLT-A(733-891)-02 |
| pGEMT_Dp_DGLTA_TFC4(408-572) | 20826 | PCR mit Primern: DpTFC4-01 und DpTFC4-02 an axenischem Stamm von D.purpureum |
| pGEMT_Dp_DGLTA_RNH(741-886) | 20825 | PCR mit Primern: DpRNH-01 und DpRNH-02 an axenischem Stamm von D.purpureum |
| pGEMT_DGLTA(RNH 763-800) | 20818 | PCR mit Primern DGLTA(763-846)-01 und DGLTA(733-800)-02 an 20586 |
| pGEMT_his6_GFP_Lt | 20816 | PCR mit Primern his6-LtGFP-01 und his6-GFP-02 an 20749 |
| pGEMT-DGLTA(769-846) | 20810 | PCR mit Primern DGLTA (763-846)-01 und DGLTA (801-846)-02 an 20586 |
| pGEMT-DGLTA(733-761) | 20809 | PCR mit Primern DGLTA(733-800)-01 und DGLTA(733-761)-02 |
| pGEMT_his6_GFP_TFC4(446-608) | 20802 | PCR mit Primern EK-01 und EK-02 an 20651 (pLEXSY_DdTFC4_GFP) |
| pGEMT-RNH(733-884) | 20801 | PCR mit Primern EK-03 und EK-02 an 20778 (pLEXSY-FLAG-RNH(733-884)) |
| pGEMT_his6_Flag_TFC4(446-608) | 20800 | PCR mit Primern EK-04 und EK-02 an 20779 (pLEXSY-FLAG-TFC4(446-608)) |
| pGEMT-DGLTA (IN-NTD.1-2) | 20768 | PCR mit Primern DGLTA (1032-1067)-01 und DGLTA (1032-1067)-02 an 20569 |
| pGEMT-DGLTA (IN-NTD.1-1) | 20767 | PCR mit Primern DGLTA (994-1033)-01 und DGLTA (994-1033) 02 an 20569 |
| pCR8/GW/TOPO-RNH759-889 | 20877 | PCR an 20852 mit Primern RNH759-889_pDM448-01 und RNH759-889_pDM448-02 dann in TOPO-GW Vektor |

| Synthetische Plasmide | von eurofins |
|----------------------------------|---------------------|
| pEX-A128-PpTFC4(416-573)co | 20952 |
| pEX-A128-TPR_D447K_D486K | 20948 |
| pEX-A2-NTDco | 20925 |
| pMiniT-Df_Skipper-2_CHD_HcpA_CHD | 20906 |
| pEX-K4-GFPcoDD-Skipper1-CHD | 20898 |
| pEX-A2-TPR7_8_9_10_co | 20896 |
| pEX-A2-TPR7_8_9_co | 20889 |
| pEX-A2-TPR8_9_co | 20888 |
| pEX-A2-TPR7_8_co | 20887 |
| pEX-A2-RNH759-879sc | 20858 |
| pEX-A2-RNH759-879sc(EKE) | 20857 |
| pEX-A2-TT_RNH759-889 | 20852 |
| pEX-A2-LEXSY RNH(733-884) | 20742 |

8.5.2 Zusätzlich verwendete Plasmide

Tabelle 19: Auflistung zusätzlich verwendeter Plasmide

| Plasmid Name | Plasmid-Nr. | Klonierung |
|---|--------------------|---|
| Plasmide für das Y2H-System | | |
| pGBKT7-IN 994-1437 | 20607 | PCR DGLTA-39 / DGLTA-IN-02 mit NcoI/BamHI verdaut und in 11255 kloniert |
| pGBKT7_DGLTA (IN-NTD) | 20747 | kloniert aus 20744 mit NcoI und BamHI in 11255 |
| pGBKT7_DGLTA (IN-CCD) | 20754 | kloniert aus 20752 mit NcoI und BamHI in 11255 |
| pGBKT7_DGLTA(IN-CTD, K1393R) | 20748 | kloniert aus 20745 mit NcoI und BamHI in 11255 |
| pGBKT7-RNH 733-879 | 20584 | mit NcoI und BamHI aus 20577 ausgeschnitten und in pGBKT7 11255 kloniert |
| pGBKT7-TFIIC4 2-219 | 20580 | mit NcoI/ BamHI aus 20563 ausgeschnitten und in 20112 pAct2 kloniert |
| pGBKT7-DdTFIIC4 219-478 | 20561 | NcoI/BamHI Fragment aus 20564 in 1.1255 kloniert |
| pGBKT7-DdTFIIC4 446-608 | 20528 | mit NcoI aus 20515 ausgeschnitten und in pGBKT7 1.1255 kloniert |
| pGBKT7-DdTFIIC1 22-401 | 20509 | mit NcoI/BamHI aus 20503 ausgeschnitten und in pGBKT7 11255 kloniert |
| pGBKT7-DdTFIIC1 420-865 | 20514 | mit NcoI/ BamHI aus 20504 ausgeschnitten und in pGBKT7 kloniert |
| pGBKT7-DGLTA RNH1 (994-1067) \equiv <u>NTD1</u> | 20569 | mit NcoI/BamHI aus 20562 ausgeschnitten und in pGBKT7 kloniert |
| pGBKT7-DdBdp1 | 20440 | PCR mit dBdp1-01/-02 an 1.1822 und direkt in pGBKT7 kloniert (NcoI/BamHI) |
| pGBKT7-DdTBP | 20435 | PCR mit dTBP-01/-02 an 1.1821 und direkt in pGBKT7 kloniert (NcoI/BamHI) |
| pGBKT7-DdBrfN | 20434 | PCR mit dBrfN-01/-02 an 1.1731 und direkt in pGBKT7 kloniert (NcoI/BamHI) |
| pGBKT7-DdBrfC | 20433 | PCR dBrfC-01/-02 an 1.1730 direkt in pGBKT7 kloniert (NcoI/BamHI) |

| Plasmid Name | Plasmid-Nr. | Klonierung |
|---|-------------|---|
| pAct2-DdTFIIIC4 446-608 | 20527 | mit NcoI aus 20515 ausgeschnitten und in pAct2 2.0112 kloniert |
| pAct2-IN 994-1437 | 20606 | PCR DGLTA-39 / DGLTA- IN-02 mit NcoI/BamHI verdaut und in 20112 kloniert |
| pAct2-DGLTA RNH1 (994-1067) = <u>NTD1</u> | 20565 | mit NcoI/BamHI aus 20562 ausgeschnitten und in pAct2 2.0112 kloniert |
| pACT2_DGLTA (IN-NTD) | 20746 | kloniert aus 20744 mit NcoI und BamHI in 20112 |
| pACT2_DGLTA (IN-CCD) | 20753 | kloniert aus 20752 mit NcoI und BamHI in 20112 |
| pACT2-DGLTA(IN-CTD, K1393R) | 20762 | kloniert aus 20761 mit NcoI und BamHI in pACT2 |
| pAct2-RNH 733-879 | 20586 | mit NcoI/ BamHI aus 20577 ausgeschnitten und in pAct2 kloniert |
| pACT2_DGLTA(RNH 733-800) | 20763 | kloniert aus 20742 mit NcoI und BamHI in pACT2 |
| pACT2-DGLTA (RNH 801-846) | 20738 | mit NcoI/ BamHI aus 20716 ausgeschnitten und in pACT2 (20112) kloniert |
| pACT2-DGLTA(RNH 845-884) | 20719 | kloniert aus 20717 mit NcoI und BamHI in 20112 |
| pACT2-DGLTA(787-846) | 20718 | kloniert aus 20714 mit NcoI+BamHI in 20112 |
| pAct2-DGLTA_Prot | 20421 | PCR mit DGLTA-PR-01/PR-02 an PCR Produkt DGLTA-01/-02 direkt in pAct2 kloniert (NcoI/BamHI) |
| pAct2-DdTBP2 | 20439 | PCR mit dTBP1-01/-02 an 1.1821 und direkt in pAct2 kloniert (NcoI/BamHI) |
| pAct2-DdBdp1 | 20438 | PCR mit dBdp1-01/-02 an 1.1822 und direkt in pAct2 kloniert (NcoI/BamHI) |
| pAct2-DdBrfN | 20437 | PCR mit dBrfN-01/-02 an 1.1731 und direkt in pAct2 kloniert (NcoI/BamHI) |
| pAct2-DdBrfC | 20436 | PCR mit dBrfC-01/-02 an 1.1730 und direkt in pAct2 kloniert (NcoI/BamHI) |
| Plasmid Retrotranspositionstest | | |
| TOPOXL-Skipper_BSRi | 20702 | BSR-Kassette aus 2.0128 als AgeI/PstI-Fragment in 20544 anschließend 3'LTR als PstI-Fragment in Vektor kloniert |

8.6 Liste der wissenschaftlichen Publikationen

Originalarbeiten

Kling, E., Spaller, T., Schiefner, J., Bönisch, D., Winckler T. (2018). Convergent evolution of integration site selection upstream of tRNA genes by yeast and amoeba retrotransposons, *Nucleic Acids Research*, Volume 46, Issue 14, 21 August 2018, Pages 7250–7260.

Spaller, T., **Kling, E.**, Glöckner, G., Hillmann, F., Winckler, T. (2016). Convergent evolution of tRNA gene targeting preferences in compact genomes. *Mobile DNA*, 7(1), 17

Posterbeiträge

Spaller, T., Schiefner, J., Kaufmann, M., **Kling, E.**, Winckler, T. (2014). TRE5-A retrotransposition in Dictyostelium reveals RNA polymerase III transcription units on the extrachromosomal rDNA element. *Posterbeitrag, Annual International Dictyostelium Conference in Potsdam*

8.7 Eigenständigkeitserklärung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazie der Fakultät für Biowissenschaften an der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Winckler von Februar 2014 bis April 2018 angefertigt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe, wobei mir die in der Danksagung erwähnten Personen unterstützend geholfen haben.

Mir ist die geltende Promotionsordnung der Fakultät für Biowissenschaften der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt.

Weiterhin versichere ich, dass diese Arbeit noch an keiner anderen Hochschule als Dissertation oder Prüfungsleistung vorgelegt wurde.

Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde von mir nicht in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit der vorgelegten Dissertation stehen.

Eva Kling

Darmstadt, den 25.10.2019

8.8 Danksagung

Diese Dissertation wurde am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Winckler angefertigt. Ihm möchte ich besonders für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie des Arbeits- und Forschungsplatzes danken. Die zu jederzeit offenstehende Tür für zahlreiche Gespräche, Diskussionen und Hilfestellungen und die weitere verlässliche und unkomplizierte Betreuung nach meiner Labortätigkeit waren eine große Unterstützung. Vielen Dank dafür!

Zudem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Christian Hammann und Herrn Prof. Dr. Gerald Schumann für die Bereitschaft zur Begutachtung meiner Arbeit bedanken.

Einen weiteren Dank möchte ich an liebe, hilfsbereite Kollegen außerhalb des Lehrstuhls richten. Dr. Ulrike Garscha, Erik Romp und vor allem Jana Fischer vom Lehrstuhl der Pharmazeutischen/Medizinischen Chemie möchte ich für die unkomplizierte Zusammenarbeit und schnelle Lösungsfindung in Sachen Fluoreszenzmikroskopie danken. Iuliia Ferling und Dr. Falk Hillmann vom Hans-Knöll-Institut danke ich für die Vertiefung dessen, sowie die geduldige und intensive Suche mit mir nach roten und grünen „Punkten“.

Ein großes DANKE geht zudem an meine lieben Kollegen des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie! Ihr habt mir eine wunderbare, freundschaftliche Wohlfühlatmosphäre beschert, an der es trotz (oder genau deshalb) gelegentlicher sprachlicher Differenzen an Sport, Spiel und Spaß nie gemangelt hat. Thomas Spaller, ich danke dir nicht nur für deine große fachliche Unterstützung, das Anlernen, Beibringen, Diskutieren und Interpretieren, sondern auch die damit kombinierte freundschaftliche Achtsamkeit, die, da waren wir uns recht schnell einig, bei solchen Projekten, wenn möglich, nie fehlen sollte! Robert Penzis, neben deiner unermüdlichen Geduld mit Monika in Sachen PC, danke ich dir zusätzlich für die Lösung aller anderen Probleme. Ohne dich wäre alles immernoch nicht so wie es sein soll. Friedemann Gaube, ich denke mit dem Satz „früher war mehr Lametta“ ist zwischen uns alles gesagt. Danke dir für viel zu viel! Daniel Heinrich, danke dir für das Aufzeigen von anderen Blickwinkeln, Lolly-Essen macht mir mit dir am meisten Spaß! Tilmann Forberger, danke dir stets für ein offenes Ohr, die schönen Gespräche und die Rennrad- und Kaffee-Kultur. Doreen Bönisch, eine bessere Vertretung, auch in Bastel- und Rechenangelegenheiten, hätte ich mir nicht wünschen können, Danke. Sigrid Schwarthoff, danke fürs Basteln, Backen und Bewirken. Anika Schmith und Michael Kaufmann, danke für die freundschaftliche Begrüßung und die

Unterstützung, auch in fachlichen Fragen. Heidemarie Graf, vielen Dank für deine liebe Art, das Zuhören und unermüdliche Kümern. Sven Adler, danke dir für saure Bohnen und den unerschöpflichen Blick für die Natur. Angela Reimann und Uwe Beck, danke für das sofortige Springen beim allzu häufigen Rufen.

Von ganzem Herzen möchte ich zudem meinen Freunden und meiner Familie danken. Ohne die unterstützenden, lieben, einfühlsamen und motivierenden Worte wäre mir die Berg- und Talfahrt bis zur Beendigung dieser Arbeit wahrscheinlich nicht gelungen. Ein herzliches „Danke“ möchte ich aussprechen an Anne Gunzer, Hanna Neumann, Miriam Fritz, Andreas Reichl, Jonas Böhm, Thorsten und Lisa Helfmann sowie Elise Daniels und Alexander Gerhardt, die immer zur richtigen Zeit für mich am richtigen Ort waren. Danke auch an Grit Haedicke und Theresa Schmidt, durch die vor allem die Schreiberei um einiges flüssiger wurde. Ein besonderer Dank gilt Francesca Panico, die nie den Glauben an mich verloren hat und mich das zu jeder Zeit hat spüren lassen. Mit dir ist sogar eine mittelständische Phosphorylierbarkeit der Aschgrauen Höckereule schaffbar. DANKE! Von ganzem Herzen danke ich zuletzt meinen Eltern, für ihre einfühlsame und bedingungslose Unterstützung über all die Jahre und meiner lieben Schwester Annette, für dich fehlen mir (immernoch) die Worte!

- ENDE -